

Universidade Estadual de Campinas

Daniela Alves Ribeiro

***“Escherichia coli* ISOLADAS DE ÁGUA DE CONSUMO:
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DAS
PROPRIEDADES DE VIRULÊNCIA”**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Genética e Biologia
Molecular na área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano
Co-orientador: Profa. Dra. Maria Célia S. Lanna

Campinas
2006

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
R.354e
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 70982
PROC. 16.P.00123-06
C _____ ☒ _____
PREÇO 11.00
DATA 19/12/06
BIB-ID 394611

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

R354e

Ribeiro, Daniela Alves

Escherichia coli isoladas de água de consumo: caracterização fenotípica e genotípica das propriedades de virulência / Daniela Alves Ribeiro. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Tomomasa Yano.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. Fatores de virulência. 3. Água de consumo. 4. Enterotoxinas. 5. Diarréia em crianças. I. Yano, Tamomasa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: *Escherichia coli* isolated from drinking water: fenotypic and genotypic characterization of virulence factors.

Palavras-chave em inglês: *Escherichia coli*; Virulence factors; Drinking water; Enterotoxins; Diarrhea in children.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Tomomasa Yano, Maria Silvia Gatti, Kinue Irino.

Data da defesa: 17/02/2006.

Campinas, 17 de Fevereiro de 2006.

Banca Examinadora

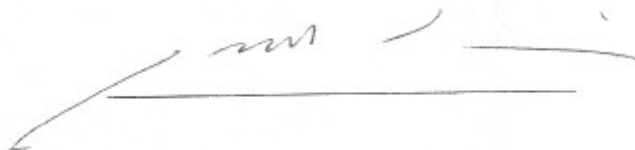
Prof. Dr. Tomomasa Yano (Orientador)



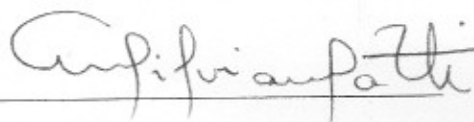
Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Profa. Dra. Kinue Irino



Prof. Dra. Maria Silvia Gatti



Prof. Dra. Cleide Cattani



200635594

"A verdadeira vida não é constituída de currículos e conquistas que aumentam nosso intelecto, mas de essência humana. A maior mensagem que podemos deixar cravada na nossa vida é aquela pela qual vamos vivê-la. Nossa vida será nossa mensagem".

“A verdadeira vida não é constituída de currículos e conquistas que aumentam nosso intelecto, mas de essência humana. A maior mensagem que podemos deixar cravada na nossa vida é maneira pela qual vamos vivê-la. Nossa vida será nossa mensagem”.

**Dedico este trabalho ao meu namorado,
Edmar, pois sem o seu apoio, incentivo
e amor nada disso se concretizaria.**

Agradecimentos

A Deus, por estar sempre presente em minha vida e pela sua imensa bondade, permitindo-me a conquista de tantas coisas.

Aos meus pais e irmãos, que compreenderam a minha ausência, me apoiaram e, principalmente, pelo amor que sempre me deram.

Ao meu namorado, que na ocasião não encontro palavras para agradecer tudo que fez por mim. Você é o grande responsável por esta conquista.

Agradeço enormemente ao meu orientador, Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela exímia orientação, por toda confiança e apoio e pela grande pessoa que é. Ao senhor, toda a minha admiração.

À Profa. Dra. Silvia Gatti, pelos seus valiosos ensinamentos, não apenas na ocasião da pré-banca, mas em todo o decorrer deste trabalho, pela participação em banca examinadora e, principalmente, por ser um exemplo de profissional.

A Dr. Cleide Catani, pela amizade, pelas sugestões em todo decorrer deste trabalho e pelos importantes comentários em exame de pré-banca.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pela disponibilidade do seu tempo e do seu laboratório e pelas sugestões que muito contribuíram para o fechamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pelas sugestões no exame de qualificação e em alguns momentos de conflitos com as técnicas moleculares e por ser mais um exemplo de profissional ao qual quero me espelhar.

Aos professores do Departamento, Dra. Clarice Weis Arns e Dr. Wanderley da Silveira, pela convivência harmoniosa.

À Profa. Dra. Kinue Irino, pelo aceite em participar da Banca examinadora.

Aos amigos do laboratório, Ana Carolina, Ana Paula, Cláudio, Daniel, Jaqueline, Luciano, Lucinha e Marcelo. Agradeço a troca de experiência e as inúmeras “gargalhadas” que deixaram a pesquisa mais engraçada.

Às colegas que não estão mais presentes na rotina do laboratório, mas que sem dúvida foram muito importantes no desenvolvimento deste trabalho: Silvia Simi, Patrícia Figueiredo e Márcia Tommy.

Aos estagiários, Cecília, Fábio, Mariana, Elder, Juliana, Letícia, Stephanie em especial à Danielle pela enorme ajuda e amizade. Agradeço os meios preparados, os sangues lavados, as bactérias semeadas e principalmente, os tubos lavados.

Aos técnicos, Ana Lúcia, Erivaldo e Evandro por sempre estarem dispostos a ajudar.

À Bióloga Mirtis Ferraz, por toda ajuda, paciência e tempo disposto na leitura das lâminas de adesão.

À Stella, pela sua amizade, assistência técnica, ensinamentos e valiosas sugestões. Muito obrigada Stelluca.

Aos amigos de departamento, Tatiane Amabile, Monique, Georgio, Cláudia Moura, Mário Paulo, Gerson, Gustavo, Aline, Helena, Maria Cláudia, Maria Clara, Guilherme, Bel, Sandra e Erich, pela convivência agradável.

Às secretárias Lúcia, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, e Lourdes, do curso de pós-graduação em genética.

Às amigas de república, Legilane, Carina, Maira, Rafaela, Marcela, Roberta, Elisângela, Cristiane, Larissa, Ainá e Mirian, pela amizade e alegrias ao longo do primeiro ano do mestrado.

A todos os colegas e professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia – IB-Unicamp.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Sumário

Agradecimentos	vi
ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Escherichia coli e as categorias diarreio gênicas	1
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)	2
1.1.2. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	5
1.1.3. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (STEC)	8
1.1.4. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	10
1.1.5. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	12
1.1.6. <i>Escherichia coli</i> de aderência difusa (DAEC)	16
1.2 Escherichia coli e água	18
1.3 Avaliação da água	21
1.4 Captação e fornecimento de água para consumo humano no município de Ouro Preto-MG	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Amostras Bacterianas	25
3.2 Estudo fenotípico das amostras de E. coli	25
3.2.1. Detecção de Hemolisinas	25
3.2.2. Detecção de aerobactina	27
3.2.3. Detecção da atividade hemaglutinante	27
3.2.4. Teste de adesão em células HEp-2	27
3.2.5. Produção e quantificação de biofilme	28
3.2.6. Pesquisa da produção de película	29

3.2.7.	Teste de citotoxicidade	29
3.2.8.	Ensaio de termoestabilidade da atividade citotóxica	30
3.2.9.	Teste do camundongo recém-nascido	30
3.3	Caracterização genotípica das amostras de E. coli	31
3.3.1.	Obtenção do DNA para a reação em cadeia da polimerase (PCR).....	31
3.3.2.	Reação em cadeia da polimerase	31
3.3.3.	Eletroforese em gel de agarose	33
4.	RESULTADOS	34
4.1	Estudo Fenotípico das amostras de E. coli.....	34
4.1.1.	Detecção de hemolisinas	34
4.1.2.	Detecção de aerobactina	35
4.1.3.	Detecção da atividade hemaglutinante.....	35
4.1.4.	Teste de adesão em células HEP-2.....	35
4.1.5.	Produção e Quantificação de Biofilme	39
4.1.6.	Pesquisa da produção de película	40
4.1.7.	Teste de Citotoxicidade.....	40
4.1.8.	Ensaio da termoestabilidade da atividade citotóxica	42
4.1.9.	Teste do Camundongo recém-nascido	42
4.2	Estudo Genotípico: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	42
4.3	Associação dos fatores de virulência de amostras de E. coli com as amostras produtoras da citotoxina.....	45
5.	DISCUSSÃO.....	48
6.	CONCLUSÕES	59
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores para ensaios de PCR, temperatura de anelamento e tamanhos (pb) expressos na amplificação.....	32
Quadro 2 - Reagentes e concentrações utilizados nos ensaios de PCR.....	33
Tabela 1 - Amostras padrão de <i>Escherichia coli</i> para fatores de virulência pesquisados fenotípica e genotipicamente no presente estudo.....	26
Tabela 2 - Números e porcentagens de amostras de <i>Escherichia coli</i> positivas em células HEp-2 para testes de adesão.....	32
Tabela 3 - Número e porcentagem de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de água positivas por PCR para fatores de virulência pesquisados.....	43
Tabela 4 - Correlação entre as amostras de <i>E. coli</i> positivas para marcadores de virulência pesquisados pela PCR com perfil de adesão em células HEp2.....	44
Tabela 5 - Associação dos fatores de virulência positivos pela PCR e do padrão de adesão em células HEp-2 com as amostras de <i>E. coli</i> produtoras da citotoxina.....	46
Tabela 6 - Número de amostras de <i>E.coli</i> classificadas, segundo padrões de adesão e marcadores de virulência, dentro dos grupos diarreio gênico e extraintestinal de <i>E. coli</i>	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Número de amostras de <i>E. coli</i> com atividade hemolítica, em placas de ágar sangue, preparadas com hemácias humanas (Hu); de carneiro (Cr); de cavalo (Cv); de cobaia (Cob) e hemácias bovinas (Bv).....	34
Figura 2 - Padrões de adesão de amostras de <i>E.coli</i> em células HEp-2.....	37
Figura 3 - Padrões de adesão de amostras de <i>E.coli</i> em células HEp-2.....	38
Figura 4 - . Formação de biofilme por amostras de <i>E. coli</i> isoladas de água.....	39
Figura 5 - Alterações morfológicas provocadas por sobrenadantes de culturas de amostras de <i>E. coli</i> em células Vero.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA: Adesão agregativa
- AAcel: Adesão agregativa em células
- AAcS: Adesão agregativa em lâminas
- AAF: Fímbria de aderência agregativa de EAEC
- AD: Adesão difusa
- AD1: Adesão difusa do tipo 1
- AD2: Adesão difusa do tipo 2
- BHI: Infuso cérebro coração
- CDT: Toxina citoletal distensora
- CN: Caldo nutriente
- CNF: Fator necrosante citotóxico
- DAEC: *Escherichia coli* de aderência difusa
- EAEC: *Escherichia coli* Enteroagregativa
- EAF: Plasmídio de aderência de EPEC
- EAST1: Toxina termo-estável de EAEC
- EIEC: *Escherichia coli* Enteroinvasiva
- EnhY: Enterohemolisina
- EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica clássica
- ETEC: *Escherichia coli* Enterotoxigênica
- Hly: Hemolisina
- LA: Adesão localizada
- LAL: Adesão “localizada Like”
- LB: Meio Luria Bertani
- LEE: Região LEE (locus de destruição do enterócito)
- LT: Toxina termo-lábil
- MM: Meio mínimo
- NA: Não aderente
- NC: Adesão não característica
- PBS: Tampão salina fosfato
- PET: Toxina codificada por plasmídio de EAEC
- PIC: Toxina envolvida na colonização de EAEC
- SAT: Toxina secretada autotransportadora
- ST: Toxina termo-estável
- Stx: Shiga toxina de STEC
- TSB: caldo tripticase-soja

RESUMO

Estudos de infecções causadas pela ingestão de águas contaminadas, em especial por *Escherichia coli*, são importantes para definir o papel dessas bactérias em casos de gastroenterites. Devido à ocorrência freqüente da diarreia infantil na cidade de Ouro Preto-MG, análises microbiológicas da sua água de consumo determinaram a presença de *E. coli*. No presente trabalho, propriedades fenotípicas e genotípicas de virulência foram estudadas em 97 amostras de *E. coli* isoladas da água de consumo desse município. Os resultados obtidos para padrões de adesão mostraram que 79 (81,4%) amostras aderiram a células HEp-2 em diferentes padrões de adesão, sendo que 49 (62%) amostras aderiram de forma agregativa, 16 (20,3%) apresentaram o padrão difuso, 12 (15,2%) aderiram de forma não característica e 2 (2,5%) apresentaram o perfil de adesão localizada “like”. Por ensaios de hemaglutinação verificou-se que 70 (72%) amostras hemaglutinaram hemácias de cobaia, 64 (65,9%) aglutinaram hemácias eqüinas, 5 (5,2%) foram positivas com hemácias humanas do grupo A e 10 (10,3%) aglutinaram hemácias bovinas. Todas essas amostras evidenciaram um perfil de hemaglutinação manose sensível, o que está associado à presença da fímbria tipo 1. Outro fator de virulência detectado foi a produção de aerobactina em 11 (11,3%) isolados. Em relação à expressão de hemolisinas em meio sólido, 50 amostras de *E. coli* foram positivas em placas de ágar sangue contendo hemácias de cavalo, 37 lisaram hemácias de carneiro, 28 lisaram eritrócitos de cobaia, nove lisaram eritrócitos humanos e seis foram positivas com hemácias bovinas. Entretanto, os sobrenadantes de cultura de todas essas bactérias não apresentaram atividade hemolítica “in vitro”. Em relação à atividade citotóxica dos sobrenadantes de cultura das amostras, verificou-se que 89 deles provocaram diferentes alterações morfológicas em células Vero, HeLa e CHO. Deste total, 39 apresentaram efeito citotóxico característico de desarranjo do citoesqueleto celular, foram estáveis ao aquecimento por 100°C e demonstraram atividade enterotóxica em camundongos recém-nascidos. Estudos genotípicos pela PCR, identificaram nove amostras *eltIA*⁺, uma amostra *stI*⁺, 14 *stIII*⁺, seis *ahLy*⁺, três *sat*⁺, três *astA*⁺, duas *pic*⁺, 10 *kps*⁺, 11 *iucD*⁺, 88 *fimH*⁺, seis *eae*⁺, três *papC*⁺ e uma *papGI*⁺. Nenhuma amostra foi positiva para os genes *stx1*, *stx2*, *stx2v*, *eltIIA*, *cnfs*, *cdt*, *enhly*, *pet*, *bfp*, *inv*, *K88* e *987p*, *aggA*, *aafA* e *papGII/GIII*. Baseado na aderência em células, na produção de toxinas e na presença de

genes de virulência, classificou-se 24 amostras como ETEC, 6 como EPEC atípicas, 36 EAEC e 13 como DAEC. Nenhuma amostra foi classificada como EHEC e EIEC. Estes resultados sugerem um possível envolvimento destas amostras de *E. coli* como um dos agentes enteropatogênicos envolvidos nas infecções entéricas ocorridas na cidade de Ouro Preto.

ABSTRACT

Infections studies caused by the ingestion of contaminated water, especially by *Escherichia coli*, are important to define the pathogenic role of these bacteria in gastroenteritis. Due to frequent infantile diarrhea in the city of Ouro Preto-MG, this city's water microbiologic analysis displayed the presence of *E. coli*. In the present study, genotypic and phenotypic virulence properties were studied among 97 *E. coli* strains isolated from the drinking water provided for this city. The obtained results for adhesion patterns showed that 81,4% of the samples adhere to HEp-2 cells in different adhesion patterns, wherein 49 strains adhere in a aggregative pattern, 16 displayed the diffuse pattern, 12 adhered in a non-characteristic pattern and 2 showed the localized adhesion profile "like". By means of hemagglutination tests we verified that 72 % of the strains hemagglutinated guinea pig erythrocytes, 65,9% agglutinated horse erythrocytes, 5,2% were positives on group A human erythrocytes and 10,3% agglutinated bovine erythrocytes. All these strains made evident a manose sensible hemagglutination profile, which is associated with type 1 fimbriae. Another virulence factor detected was the production of aerobactin in 11,3% of the isolates. Regarding the hemolysin expression in solid medium, 50 *E. coli* strains were positive in blood agar plates containing horse erythrocytes, 37 lysated sheep erythrocytes, 28 lysated guinea pig erythrocytes, 9 lysated human erythrocytes and 6 were positives on bovine erythrocytes. However, the culture supernatants of all these bacterias didn't displayed any hemolytic activity "in vitro". This could be associated with a possible β -hemolysin production. In respect of the cytotoxic activity produced by the strains culture supernatants, we verified that 89 of them provoked different morphological alterations in Vero, HeLa and CHO cells. From these, 39 showed a characteristic cytotoxic effect of disarrangement of the cellular cytoskeleton, remained stable when heated by 100°C and also showed enterotoxic activity in suckling mice. Genotypic studies performed by PCR identified nine *eltIA*⁺ strains, one *stI*⁺ strain, 14 *stIII*⁺, six *ahLy*⁺, three *sat*⁺, three *astA*⁺, two *pic*⁺, 10 *kps*⁺, 11 *iucD*⁺, 88 *fimH*⁺, six *eae*⁺, three *papC*⁺ and one *papGI*⁺. None of these results were positive for the following genes *stx1*, *stx2*, *stx2v*, *eltIIA*, *cnfs*, *cdt*, *enhly*, *pet*, *bfp*, *inv*, *K88 e 987p*, *aggA*, *aafA e papGII/GIII*. Based on the adherence to cells, toxin production and the presence of the virulence genes, 24 strains were classified as ETEC, 6 as atypical EPEC, 36 as EAEC and

13 as DAEC. Anyone strain were classified as EHEC and EIEC. These results suggest a possible involvement of these *E.coli* strains as one of the enteropathogenic agents related with the enteric infections occurred in the city of Ouro Preto.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli* e as categorias diarreio gênicas

Theodore Escherich (1855) descreveu um microrganismo que se encontrava em altas densidades nas fezes humanas e foi por ele nomeado *Bacterium coli*. No início do século passado (1912), *Bacterium coli* já era utilizada como indicador da qualidade sanitária da água. Na década de 1950, esta bactéria passou a ser denominada *Escherichia coli* pelos microbiologistas e foi escolhida como modelo para estudos de processos biológicos básicos, tais como vias metabólicas, regulação gênica, transdução de sinais, estrutura de parede celular e conjugação (Kuhnert *et al.*, 2000).

O gênero *Escherichia* é composto por cinco espécies: *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*. A espécie *E. coli* é um dos principais componentes da família *Enterobacteriaceae*, presente na microbiota intestinal de humanos e animais (Kuhnert *et al.*, 2000). Esta família é constituída por bactérias que não esporulam, são Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, oxidase-negativas e capazes de fermentar glicose com formação de gás (Bopp *et al.*, 1999).

A maioria das linhagens de *E. coli* são comensais, porém, algumas podem causar uma variedade surpreendente de doenças, incluindo diarreia, disenteria, síndrome hemolítica-urêmica, infecções de bexiga e rim, septicemia, pneumonia e meningite (Kaper *et al.*, 2004). Essa versatilidade tem sido associada ao fato de diferentes linhagens de *E. coli* terem adquirido diferentes genes de virulência (Gilligan, 1999). Estima-se que 10-20% da informação genética encontrada em uma *E. coli* patogênica não está presente na linhagem K-12, não patogênica (Kuhnert *et al.*, 2000).

O estudo da virulência em *E. coli* tem se concentrado nas doenças do trato urinário e nas doenças intestinais, pois ela está fortemente associada com a diarreia humana, principalmente a infantil. Conseqüentemente *E. coli* tem um importante papel na mortalidade infantil nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (World Health Organization, 1997; Gilligan, 1999).

Desde 1945, quando foi verificado o primeiro caso de diarreia associada a uma linhagem de *E. coli*, o conhecimento a respeito de como esta bactéria causa diarreia tem aumentado muito. Como todos os microrganismos que causam diarreia, *E. coli* são ingeridas através de alimentos e águas contaminados com fezes humanas ou de animais. Os

mecanismos de patogenicidade de *E. coli* são complexos e envolvem um grande número de fatores de virulência, que variam em suas diferentes categorias. Muitos destes fatores parecem ter sido adquiridos de outros patógenos entéricos, como *Vibrio cholerae* e *Shigella dysenteriae* (Gilligan, 1999). Toxinas e fatores de adesão são os fatores de virulência mais comumente encontrados em *E. coli*. Algumas toxinas são intimamente relacionadas com determinadas categorias desta bactéria (Kuhnert *et al.*, 2000).

As amostras de *E. coli* associadas à infecção intestinal e causadora de diarreia ou disenteria, são conhecidas como *E. coli* diarreio gênicas e são classificadas em seis categorias, (Nataro & Kaper, 1998). As categorias de *E. coli* diarreio gênicas são: *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC), subdividida em EPEC típicas e atípicas, enterotoxigênica (ETEC), enterohemorrágica (STEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) (Kaper *et al.*, 2004).

1.1.1. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

EPEC é uma das maiores causas de diarreia aguda em crianças, principalmente em países em desenvolvimento (Kaper *et al.*, 2004) e com relativa frequência está associada a casos de diarreia persistente (Fagundes-Neto, 1996; Scaletsky *et al.*, 1999b). Estudos epidemiológicos demonstram que EPEC são responsáveis por mais de 30% dos casos de diarreia em crianças no Brasil (Gomes *et al.*, 1991; Toledo *et al.*, 1983) e resultados semelhantes foram relatados na Cidade do México e no Chile (Cravioto *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1993).

EPEC classicamente é caracterizada devido ao seu padrão de adesão localizada (LA) em células epiteliais (Scaletsky *et al.*, 1984). Este grupo de *E. coli* é responsável por desencadear o fenômeno denominado “attaching and effacing” (lesão A/E) em células HEp-2, HeLa e no epitélio intestinal. Esta lesão é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais e rearranjo do citoesqueleto celular, culminando na formação de uma estrutura semelhante a um pedestal onde a bactéria permanece intimamente ligada (Moon *et al.*, 1983).

Os genes envolvidos na formação da lesão A/E estão presentes em uma ilha de patogenicidade denominada “Locus of Enterocyte Effacement” (LEE). Essa ilha também conhecida como região LEE é subdividida em cinco operons, denominados *LEE 1*, *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* e *Tir* (ou *LEE5*) (Elliot *et al.*, 1998). A região LEE codifica um sistema de

secreção do tipo III (Jarvis *et al.*, 1995), a adesina não fimbrial intimina (Jerse, *et al.*, 1990) e o próprio receptor da intimina, a proteína “Translocated intimin receptor” (Tir) (Kenny, *et al.*, 1997), a qual é translocada para a célula hospedeira pelo sistema de secreção do tipo III.

Em experimentos em que são utilizadas linhagens de células humanas têm-se observado a presença de vários genes com suas respectivas proteínas induzindo a formação da lesão A/E. Sonnenberg e Kaper (1992), sugeriram um modelo em três estágios da infecção de EPEC. O primeiro estágio (aderência localizada) envolve uma interação íntima da bactéria com a superfície da célula hospedeira, mediada por uma fímbria do tipo IV denominada BFP (“bundle-forming-pilus”) (Girón *et al.*, 1991a). O *bfp* é um conjunto de 14 genes que fazem parte de um plasmídeo de 60 MDa denominado EAF (“EPEC Adherence factor”) (Stone *et al.*, 1996).

O segundo estágio (transdução de sinais), envolve um aparato de secreção do tipo III, que induz a secreção de proteínas de EPEC, chamadas Esps (“*E. coli* secreted proteins”), sendo elas: EspA, EspB, EspD, EspF, EspG, Map e Tir, sendo que EspA, B e D são componentes do aparato de secreção (Jarvis *et al.*, 1995). As funções de poucas destas proteínas são conhecidas em detalhes. De uma forma geral, elas desencadeiam a transdução de sinais em cascata nas células hospedeiras (Kenny & Finlay, 1995), levando a um rearranjo dos componentes do citoesqueleto. Os genes responsáveis pela codificação destas proteínas estão inseridos na região LEE (Elliot *et al.*, 1998).

O terceiro estágio (aderência íntima) envolve a atividade do gene cromossômico *eae*, que expressa a proteína intimina, responsável pelo contato íntimo entre a bactéria e a célula epitelial. O acúmulo de filamentos de actina e outras proteínas do citoesqueleto como α -actina, talina, miosina e ezrina formam o pedestal (Finlay *et al.*, 1992).

Segundo observações de Hicks *et al.* (1998), a fímbria BFP não estaria envolvida nos estágios iniciais da infecção da EPEC em culturas celulares. A adesão inicial ocorreria através de outra adesina diferente do BFP, ainda desconhecida. A BFP estaria envolvida em um quarto e novo estágio, produzindo uma expansão tridimensional das microcolônias, e estas seriam mantidas e estabilizadas pela própria BFP que ligaria uma bactéria à outra.

Além da BFP, diversas adesinas já foram descritas em EPEC como responsáveis pela adesão a células epiteliais, como a proteína de membrana externa intimina (Sonnenberg & Kaper, 1991), os filamentos EspA do sistema de secreção tipo III (Knutton *et al.*, 1998) e, recentemente, foi reportado que o flagelo de EPEC funciona como uma

adesina essencial na formação da microcolônia localizada (Girón *et al.*, 2002). Outras adesinas ainda são investigadas como sendo participantes do processo de adesão de EPEC à mucosa intestinal, entre as quais a fímbria tipo I que vem sendo relacionada à patogênese de outros membros da família Enterobacteriaceae, cujo papel na patogênese de *E. coli* uropatogênica vastamente conhecido (Gunther *et al.*, 2001). Em EAEC a sua participação na formação do padrão agregativo de adesão às células epiteliais e na formação de biofilme já foi estabelecido (Moreira *et al.*, 2003). Entretanto para a categoria EPEC sua participação no estabelecimento da adesão localizada foi refutada (Elliot & Kaper, 1997).

Os genes *eae* de várias amostras EPEC e EHEC têm sido clonados e seqüenciados (Beebakhee *et al.*, 1992, Frankel *et al.*, 1994; Jerse *et al.*, 1990; Yu & Kaper, 1992). Ao comparar as seqüências de aminoácidos das proteínas codificadas por estes genes em EPEC e EHEC, verificou-se que ambas possuem diferentes intiminas, revelando que as regiões N-terminais são altamente conservadas e que as porções C-terminais, são variáveis sendo responsáveis pela ligação aos receptores das células epiteliais (Frankel *et al.*, 1994).

As cepas EPEC são divididas em dois grupos: EPEC típicas (presença de gene *eae* e plasmídio EAF) e EPEC atípicas (presença somente do gene *eae*) (Trabulsi *et al.*, 1996). As EPEC típicas, ou simplesmente EPEC, são bastante homogêneas em suas propriedades de virulência, pois expressam basicamente os fatores de virulência codificados pela região LEE e pelo plasmídio EAF. Por outro lado, as EPEC atípicas não são portadoras do plasmídio EAF, mas possuem o gene *eae* e demais fatores de virulência codificados na região LEE. As EPEC típicas e atípicas também diferem no padrão de adesão em células. As EPEC típicas apresentam somente o padrão de adesão localizada, enquanto que as atípicas apresentam o padrão de adesão “localizada Like” (LAL), podendo também apresentar adesão difusa (AD) e adesão agregativa (AA) (Trabulsi *et al.*, 2002).

Em algumas EPEC atípicas foi detectado a produção de uma enterotoxina, denominada EspC, que aumenta a corrente de curto circuito em ensaios “in vitro” de “ussing chambers” (Stein *et al.*, 1996). Essa toxina de 110 kDa mostrou homologia significativa com os membros da família das proteínas com atividade de protease da imunoglobulina A (IgA), as quais são encontradas em várias bactérias patogênicas como, *E. coli* aviária (TSH), *Haemophilus influenzae* (Hap), e *Shigella flexneri* (SepA) (Stein *et al.*, 1996).

Recentemente, foi reportado no Brasil, declínio na frequência de EPEC típicas e aumento na frequência de atípicas, achados que coincidem com a diminuição nos casos de diarreia em algumas regiões. Essa mesma situação já havia sido observada nos Estados Unidos e países da Europa (Trabulsi *et al.*, 2002).

Provavelmente a diarreia causada por EPEC resulta de múltiplos mecanismos, incluindo secreção de íons, aumento da permeabilidade intestinal, inflamação intestinal e perda superfície de absorção devido à lesão A/E (Kaper *et al.*, 2004).

1.1.2. *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

A importância deste grupo como uma das principais causas de diarreia foi reconhecida na década de 1960 e, a partir desta década, um grande número de informações sobre epidemiologia e patogênese das ETEC tem sido acumulado (Guth, 2000).

Cepas ETEC causam diarreia aguda em humanos e animais em todo mundo, sendo responsáveis pela alta mortalidade infantil em países em desenvolvimento (Cravioto *et al.*, 1991). Também é responsável pela diarreia dos viajantes (Merbon *et al.*, 1976). Em animais, alguns estudos revelaram que ETEC é o agente causador de cerca de um terço das diarreias em leitões (Soderling & Mollby, 1978).

A infecção por ETEC pela ingestão de alimentos ou água contaminados. No aparelho digestivo, estas bactérias colonizam a porção distal do intestino delgado (Hinson & Willians, 1989) e produzem enterotoxinas responsáveis pela síndrome diarreica (Betley *et al.*, 1986). As enterotoxinas produzidas por este grupo de *E. coli* pertence à classe de toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST), que se diferenciam na estrutura, antigenicidade e mecanismos de ação (Sears & Kaper, 1996).

A enterotoxina termolábil possuem estrutura e função semelhante à toxina colérica (TC) de *Vibrio cholerae* (Sixmar *et al.*, 1993) e é dividida em duas subclasses: LT-I e LT-II. A toxina LT-I é expressa por amostras de *E. coli* que são patogênicas para o homem e animais, principalmente suínos, enquanto que a LT-II é encontrada principalmente em bovinos e raramente em humanos. A primeira é uma proteína oligomérica de 85kDa, composta de cinco subunidades B e uma subunidade A. As subunidades B ligam-se ao intestino através do receptor GM1, enquanto a subunidade A é responsável pela atividade

enzimática da toxina (Tenenberg *et al.*, 1994). A ação desta toxina baseia-se na estimulação da enzima adenil-ciclase, promovendo uma elevação dos níveis de AMPc nos enterócitos, o que leva à perda de potássio e íons bicarbonato pela célula, com conseqüente secreção de líquido para a luz intestinal e diarreia (Kaper *et al.*, 2004). A atividade biológica desta enterotoxina pode ser estudada em testes de alça ligada de intestino de coelho e cultura de células Y-1 (Sack & Sack, 1975), Vero e CHO (Donta *et al.*, 1974).

A toxina LT-II possui 55-57% de homologia na seqüência de aminácidos com LT-I e TC (Fukuta *et al.*, 1988), sendo que esta toxina possui duas variantes LTIIa e LTIIb (Guth *et al.*, 1986). A LT-II aumenta o AMPc semelhantemente à LT-I, entretanto, usa como receptor GD1 (Fukuta *et al.*, 1988). Apesar da similaridade com a toxina colérica a LT-II não é neutralizada pela sua antitoxina (Fukuta *et al.*, 1988; Sears & Kaper 1996).

Quanto à codificação gênica, LT-I tem sido descrita como presente em plasmídios de alto peso molecular (Gyles *et al.*, 1974). Por outro lado, a codificação da enterotoxina LT-II (87kDa), também composta de subunidades A e B, está localizada no cromossomo bacteriano (Holmes *et al.*, 1986). O efeito citotônico desta enterotoxina é semelhante ao da LT-I em ensaios utilizando cultura de células Y-1, não apresentando esta atividade em células Vero (Fukuta, *et al.* 1988).

Comparando-se a LT-II com a LT-I não foram observadas reações sorológicas cruzadas entre as duas enterotoxinas por provas de aglutinação, precipitação e neutralização do efeito biológico (Fukuta *et al.* 1988).

As enterotoxinas termoestáveis (STa e STb) são capazes de resistir ao tratamento térmico, a 100°C por 30 minutos, sendo que STa, também denominada por alguns autores de STI, apresenta peso molecular de aproximadamente 2kDa, é solúvel em água e em solventes orgânicos, além de ser resistente à ação de enzimas proteolíticas (Alderete & Robertson, 1978). Por outro lado, a enterotoxina STb, também denominada de STII, tem peso molecular de 5kDa, é insolúvel em metanol, ativa em alça ligada intestinal de suínos de 5 a 7 semanas e estimula secreção intestinal por um mecanismo que não envolve alterações das concentrações de nucleotídeos cíclicos (Kennedy *et al.*, 1984), mas eleva concentrações citosólicas de Ca^{2+} , estimula a liberação de prostaglandina E_2 e estimula a liberação de serotonina, mecanismos que permitem aumento de secreção de íons com conseqüente diarreia (Kaper *et al.*, 2004).

A codificação da enterotoxina STb é controlada por genes plasmidiais (Echeverria *et al.*, 1985) e, apesar de ser importante na diarreia em suínos, sua relevância na diarreia humana não é comprovada, embora já tenha sido detectada em amostras de *E. coli* de origem humana (Nataro & Kaper, 1998).

A toxina STa é codificada por um plasmídio de alto peso molecular e, geralmente, está associada a genes codificadores de fatores de colonização (CFAs). Esta toxina se liga a receptores das células intestinais e ativa a enzima guanil ciclase, o que leva a um aumento dos níveis de GMPC, resultando em secreção de líquido para a luz intestinal e subsequente diarreia (Mühldorfe & Hacker, 1994).

A adesão deste grupo ocorre através de fatores de colonização (CFA). Esses fatores podem ser fimbriais e adesinas não fimbriais (Blanco *et al.*, 1993), representados por filamentos protéicos delgados ou por proteínas amorfas que cobrem a superfície bacteriana. Os mais frequentemente pesquisados em seres humanos são os CFA/I (Evans *et al.*, 1975), representados por fímbrias rígidas em forma de bastão e compostas por apenas uma unidade antigênica (Jann & Hoschutsky, 1991), complexo CFA/II (Evans *et al.*, 1978) e o conjunto CFA/IV (Thomas *et al.*, 1982) que são formados por um complexo antigênico denominado antígeno de superfície de *E. coli* (CS). Mais de 20 tipos de CFAs de ETEC foram descritos (Kaper *et al.*, 2004).

Recentes estudos têm indicado que as ETEC, similarmente a outras classes diarreogênicas, possuem genes de virulência além dos já conhecidos codificadores das toxinas e fatores de adesão. Incluído nestes novos genes está *tibA*, o qual codifica uma adesina membro da família das proteínas autotransportadoras, que exercem diferentes papéis na patogênese bacteriana (Henderson & Nataro, 2001). Patel *et al.* (2004), identificaram na cepa protótipo ETEC H10407, uma proteína de membrana, também da família de proteínas autotransportadoras, que pode ser explorada para o desenvolvimento de vacinas. O gene identificado em H10407, *eata* (“ETEC autotransporter A”), codifica uma proteína de 110kDa com atividade de serina protease que mostrou homologia com SepA, uma proteína secretada por *Shigella flexneri*. Este gene está contido em um plasmídio de virulência de 92 kDa e foi encontrado em diversos isolados clínicos de ETEC. Mutantes deficientes no gene *eata* induziram decréscimo no acúmulo de líquido em modelo de alça ligada de intestino de coelho, sugerindo que esta proteína contribui para a virulência de ETEC.

1.1.3. *Escherichia coli* enterohemorrágica (STEC)

“Shiga toxin-producing” *Escherichia coli* (STEC), também chamada “Verotoxin-producing” (VTEC), têm emergido como patógenos que contaminam alimentos (Karmali, 1989), provocam diarreia sanguinolenta (Levine, 1987) e causam severas doenças no homem, como colite hemorrágica (HC) e síndrome urêmica hemolítica (HUS) (Karmali, 1989).

A categoria diarreio gênica EHEC foi primeiramente reconhecida devido ao sorotipo O157:H7, o qual acredita-se ser responsável por mais de 90% de todos os casos de HUS em países industrializados (Mead & Griffin, 1998). Esta bactéria foi reconhecida como patógeno humano em 1982, quando foi implicada em dois surtos de colite hemorrágica (Riley *et al.*, 1983). Em 1983, Karmali e colaboradores reportaram associação entre infecção com *E. coli* que produz toxina de shiga (assim chamada devido à semelhança genética com a toxina Siga de *Shigella dysenteriae*), com a síndrome urêmica hemolítica. Posteriormente, *E. coli* O157: H7 foi geneticamente relacionada à *E. coli* O55: H7, uma cepa enteropatogênica que causa diarreia em crianças em todo mundo (Whittam *et al.*, 1993).

Assim como EPEC, *E. coli* O: 157: H7 pode aderir ao epitélio intestinal e produzir a característica lesão A/E. Kaper & Jarvis (1996) demonstraram que as EHEC produzem intimina que também é codificada pelo gene *eae*. Acredita-se que os fatores de virulência adicionais desta bactéria tenham sido adquiridos por transferência horizontal e recombinação gênica (LeClerc *et al.*, 1996).

O principal fator de virulência das EHEC é a produção das toxinas de Shiga (Stx), extremamente potentes e responsáveis por muitos dos sintomas observados (Nataro & Kaper, 1998). Essas toxinas são também chamadas verotoxinas por serem tóxicas em culturas de células Vero (Konowalchuk *et al.*, 1977) e apresentam dois grupos principais imunologicamente distintos e não passíveis de reações cruzadas, chamados Stx1 e Stx2. Uma cepa EHEC pode expressar uma ou ambas toxinas ou ainda múltiplas formas da Stx2. A toxina Stx1 é indistinguível da Shiga toxina produzida por *S. dysenteriae*; já Stx2 é uma molécula mais divergente com 56% de homologia de aminoácidos com a toxina acima mencionada (Mead & Griffin, 1998). Dados sugerem que cepas produtoras de Stx2 estão mais relacionada com o desenvolvimento de HUS (Griffin, 1995).

As toxinas Shiga pertencem ao grupo das toxinas tipo A/B, isto é, apresentam uma subunidade do tipo A, que é enzimática, e 5 subunidades do tipo B, que são oligômeros constituídos de 5 proteínas idênticas (Mead & Griffin, 1998). Entre si, a Stx1 e Stx2 da EHEC apresentam 55% de homologia na sequência da subunidade A e 57% na sequência da subunidade B (Jackson *et al.*, 1987). A estrutura da Stx1 é altamente conservada entre as cepas EHEC, mas há variações na sequência da Stx2. Essas variantes são designadas Stx2c, Stx2v, Stx2hb, Stx2e etc (Calderwood *et al.*, 1996).

As subunidades B medeiam a ligação da toxina à célula hospedeira, por meio de receptores específicos. Na maioria dos casos esse receptor é a globotriacilceramida (Gb3), um glicolípido presente na superfície das células eucarióticas, enquanto a variante Stx2e utiliza o Gb4 como receptor. Uma vez ligada à célula, a subunidade A da toxina, que é uma N-glicosidase, remove um único resíduo de adenina do rRNA 28S, inibindo a síntese de proteínas. Essa inibição leva à morte de células endoteliais renais, células epiteliais intestinais, células Vero, HeLa ou qualquer outra que contenha Gb3 (ou Gb4 no caso da Stx2e) (Nataro & Kaper, 1998). As células renais são ricas em receptores Gb3, o que poderia explicar a localização específica das sequelas da infecção (Moss *et al.*, 2000).

Os genes responsáveis pela codificação das subunidades A e B das toxinas Shiga da EHEC (*stxAB*, também chamados *sltAB* ou *vtxAB*) estão organizados em operons, codificando primeiro a subunidade A e depois a B. Os genes da Stx1 são carregados por bacteriófagos e os da Stx2 podem ser encontrados tanto em bacteriófagos como no cromossomo bacteriano (Nataro & Kaper, 1998; Paton & Paton, 1998a).

As cepas O157: H7 e outros sorotipos isolados de humanos carregam um plasmídio altamente conservado, chamado pO157 ou plasmídio 60-MDa (Levine *et al.*, 1987), cujo tamanho varia de 93,6 a 104 kb. Este plasmídio contém o gene *ehxA* ou *hlyA*, que codifica uma hemolisina chamada enterohemolisina ou hemolisina de EHEC (Schmidt *et al.*, 1996). A hemolisina pertence à família RTX (Repeat in Toxin) de citolisinas formadoras de poros, também encontradas em *E. coli* uropatogênica, *Pasteurella haemolytica* e outros patógenos (Bauer & Welch, 1996). O papel da enterohemolisina ainda é objeto de estudo, podendo estar associado à lise de eritrócitos “in vivo”, liberando heme e hemoglobina. Isso estimularia o crescimento bacteriano, pois cepas EHEC possuem um sistema altamente especializado de utilização de heme e hemoglobina como fonte de ferro (Law & Kelly, 1995). Para *E. coli* O157: H7, havendo limitação de ferro, uma proteína de membrana de

69-kDa é sintetizada e codificada pelo gene *chuA* (*E. coli* heme utilization gene). Schmitd & Karch, 1996, descreveram um gene, homólogo ao *chuA*, e encontrado em cepas de *Shigella dysenteriae* tipo 1.

O plasmídeo pO157 também codifica outros produtos potencialmente patogênicos: uma proteína (KatP) altamente homóloga à família bifuncional catalase-peroxidase; uma serina protease (EspP) capaz de clivar a pepsina e o fator V de coagulação humana; um conjunto de 13 genes (*etpC-O*), altamente homólogo ao que codifica a via de secreção tipo II das bactérias Gram negativas e que está envolvido na secreção de fatores patogênicos; uma toxina (ToxB) que apresenta 20% de homologia com a toxina B de *Clostridium difficile* e um gene (*tagA*), que codifica uma lipoproteína de membrana e que pode estar relacionada à patogenicidade porque é homólogo ao encontrado em *Vibrio cholerae* (Makino *et al.*, 2001).

A adesina Saa também é outro fator de virulência recentemente identificado em cepas *eae* negativas de STEC. O gene *saa* apresenta localização plasmidial e está associado com a adesão bacteriana em culturas de células em um padrão de aderência semi-localizado. Cepas contendo este gene foram isoladas de pacientes com HUS (Paton *et al.*, 2001) e sua presença está sendo utilizada como um marcador de virulência em testes diagnósticos (Paton & Paton, 2002).

O trato intestinal de ruminantes, particularmente bovinos e ovinos, parece ser o principal reservatório de cepas EHEC O157: H7, O157: NM e para todas STEC (Griffin & Tauxe, 1991). Estudos ambientais têm mostrado que este microrganismo pode persistir no estrume, cocho de água e outros locais de fazendas (MacDonald *et al.*, 1996).

Surtos epidêmicos ocasionados por O157: H7, oriundas de água contaminada, ocorrem através do consumo e recreação em água não clorada. Contaminação diretamente pelo contato pessoal e transmissão através da água sugere que *E. coli* O157: H7 tem uma baixa dose de infecção, similar à *Shigella sonnei* (Mead and Griffin, 1998).

1.1.4. *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

Escherichia coli enteroinvasiva compreende um grupo de bactérias conhecido pela capacidade de invadir células. Este grupo provoca disenteria semelhante à causada por *Shigella dysenteriae* (Formal & Hornick, 1978). As amostras de EIEC são bioquímica,

genética e patogenicamente relacionadas com *Shigella* spp. (Brenner *et al.*, 1973). Dupont *et al.*, (1971) descreveram EIEC como um grupo que provoca diarreia aquosa e quadro febril, com capacidade de invadir células do intestino grosso. A diarreia aquosa pode ser indistinguível das diarreias secretórias observadas em ETEC. Apenas uma minoria dos pacientes desenvolve a síndrome disentérica, causada por febre, dor abdominal, mal-estar e diarreia aquosa com sangue e muco (Taylor *et al.*, 1988).

EIEC pode ser caracterizada por seus antígenos O, sendo os mais frequentes: O28:H⁻, O124:H30, O136:H⁻, O173:H⁻ (Ørskov *et al.*, 1991), pela ausência do antígeno flagelar e pela capacidade de causar ceratoconjuntivite em cobaios (Formal & Hornick, 1978). O indicativo mais importante para o reconhecimento de uma amostra EIEC é o teste da descarboxilação da lisina negativo. Este grupo não fermenta lactose ou fermenta tardiamente e não possui flagelo, sendo, portanto, imóvel (Taylor *et al.*, 1988).

As infecções por EIEC ocorrem usualmente através de água ou alimentos contaminados, embora a infecção pessoa-pessoa possa ocorrer. A dose infectante de EIEC em voluntários é mais alta do que para *Shigella* spp. (10^8 e 10^2 células, respectivamente), o que contribui para um potencial menor de transmissão através do contato pessoal (Harris *et al.*, 1985).

A expressão dos fatores de virulência de EIEC depende de genes cromossômicos e plasmidiais. Os genes necessários para invasão estão contidos em um plasmídio de 140 MDa, chamado pInv (Baudry *et al.*, 1987). Dentre os genes relacionados com a invasão, aqueles contidos nos loci *mxi* e *spa*, codificam para um aparato de secreção do tipo III (Andrews *et al.*, 1991), necessário para a expressão de múltiplas proteínas necessárias à patogenicidade de EIEC (Nataro & Kaper, 1998).

As EIEC invadem o intestino através das células M do sistema linfático específico da mucosa (MALT), com subsequente formação de vesículas denominadas vacúolos endocíticos. Após, ocorre lise desses vacúolos e alterações do citoesqueleto celular que culminam no movimento bacteriano. Este movimento, que ocorre dentro do citoplasma da célula hospedeira, é mediado pela nucleação da actina celular em uma espécie de “cauda” que se forma em um dos pólos da bactéria (Adam *et al.*, 1995). Posteriormente, mais actina é adicionada à cauda, o que “impulsiona” a bactéria através do citoplasma, geralmente na direção lateral, até alcançar a célula adjacente através de protuberâncias na membrana citoplasmática (Prevost *et al.*, 1992). A invasão da mucosa por EIEC provoca intensa

reação inflamatória tecidual e disenterica e, embora EIEC seja invasiva, sua disseminação através da submucosa é rara (Kaper *et al.*, 2004). Muitas destas características da patogênese de EIEC são resultado dos múltiplos efeitos do sistema de secreção tipo III, que secreta as proteínas IpaA, IpaB, IpaC e IpaD e medeia eventos de sinalização, rearranjos do citoesqueleto, lise do vacúolo endocítico e outras ações (Tran Van Nhieu *et al.*, 2000).

A capacidade de invasão de EIEC é determinada pelo teste de Sereny (Sereny, 1955), porém, atualmente a invasão é facilmente visualizada em experimentos em culturas de células HEP-2 (Day *et al.*, 1981) e HeLa (Bessen & Gotshall, 1987).

Embora o sistema de secreção do tipo III seja essencial para as características invasivas de EIEC e *Shigella spp.*, fatores de virulência adicionais têm sido descritos, incluindo um plasmídeo que codifica uma serina-protease SepA, um sistema de aquisição de ferro codificado por genes do cromossomo e outras proteases que são codificadas por genes contidos em ilhas de patogenicidade (Kaper *et al.*, 2004). Uma proteína de superfície essencial para a nucleação dos filamentos de actina e conseqüentemente para o movimento através do citoplasma e entrada das células adjacentes, chamada VirG (IcsA), é outro importante fator de virulência destas bactérias (Goldberg *et al.*, 1993; Sansonetti, 1992). Nataro *et al.* (1995), clonaram e sequenciaram um gene denominado *sen* que codifica uma proteína de 63 kDa. A deleção desse gene em amostras EIEC levou a uma considerável diminuição do efeito enterotóxico da amostra mutante (Nataro & Kaper, 1998). Essa proteína termolábil foi denominada ShET-2.

1.1.5. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é reconhecida como um patógeno emergente que causa diarreia em crianças e adultos em todo o mundo. Estudos recentes têm envolvido EAEC em casos de diarreia persistente, principalmente em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (Bernier *et al.*, 2002).

A principal característica da EAEC é sua capacidade de apresentar um padrão de aderência, em células HEP-2 e HeLa, caracterizado pela presença de agregados de células bacterianas que aderem à superfície celular bem como à superfície da lamínula, em um arranjo semelhante a tijolos empilhados – aderência agregativa (AA) (Nataro *et al.*, 1987). Esta característica permite que se diferencie amostras EAEC de amostras EPEC ou DAEC.

Foi demonstrada uma associação entre AA e a presença de um plasmídio de alto peso molecular (60 MDa) em uma amostra protótipo (17-2), isolada de uma criança com diarreia no Chile (Vial *et al.*, 1987). Um segmento de função desconhecida obtido deste plasmídio tem sido utilizado como sonda genética (sonda de EAEC) em ensaios de hibridização para detecção do fenótipo AA (Baudry *et al.*, 1990). Entretanto, essa sonda apresenta sensibilidade relativamente baixa (40 a 70%), uma vez que várias amostras produtoras de AA e não portadoras de seqüências homólogas foram descritas em diferentes regiões geográficas (Echeverria *et al.*, 1992; Gomes *et al.*, 1998).

Albert *et al.* (1993) propuseram um ensaio diagnóstico simples para EAEC, que consiste na formação de uma película, isto é, de um agregado de crescimento bacteriano na superfície do meio líquido. A estrutura ou substância responsável por essa película não foi determinada, embora alguns estudos tenham demonstrado que a perda do plasmídio de aderência leva à perda desta propriedade (Yamamoto *et al.*, 1991).

Estudos histopatológicos têm demonstrado que EAEC promove aumento na secreção de muco em porcos gnotobióticos (Tzipori *et al.*, 1992) e em alça intestinal ligada de coelhos (Vial *et al.*, 1987), sendo que as bactérias aparecem emaranhadas no muco, formando um biofilme e agregadas entre si, lembrando o padrão AA característico.

Cepas EAEC são heterogêneas tanto pelos sintomas desenvolvidos pelas pessoas infectadas, quanto pelos genes de virulência. Diversos tipos de fímbrias têm sido descritos para EAEC (Vial *et al.* 1987; Old *et al.*, 1989; Knutton *et al.*, 1992), embora apenas duas delas, denominadas “Aggregative adherence fimbriae I (AAF/I) e Aggregative adherence fimbriae II (AAF/II)” tenham sido mais bem caracterizadas. Essas fímbrias são codificadas, respectivamente, pelos genes *aggA* e *aafA*, contidos no plasmídio de aderência. AAF/I confere o fenótipo agregativo e hemaglutinação a eritrócitos humanos e AAF/II está envolvida na aderência da mucosa intestinal (Huang & DuPont, 2004). A fímbria AAF/I é formada por duas regiões (Nataro *et al.*, 1993); uma região contendo o gene *aggA* que codifica a subunidade estrutural e outra contendo o gene *aggR*, que é o ativador transcricional (Nataro *et al.*, 1994). Com base na seqüência de nucleotídeos de *aggA* e *aafA* foi proposto que essas fímbrias pertençam à família Dr de adesinas encontradas em cepas de *E. coli* patogênicas extraintestinais (Nowicki *et al.*, 1990). Contudo, dados epidemiológicos indicam que somente uma minoria de cepas EAEC (10-15%) isoladas de diferentes regiões do mundo possuem AAF/I e/ou AAF/II (Czeczulin *et al.*, 1997). Isto

sugere a existência de outras adesinas, ainda não caracterizadas, em um grande percentual de cepas EAEC. Uma terceira estrutura fimbrial (AAF/III) codificada por plasmídio foi recentemente isolada da cepa EAEC 55989. Em contraste com a morfologia de feixes de AAF/I e AAF/II, a fímbria AAF/III parece com um filamento longo e flexível que, além da adesão em células, também promove a agregação bacteriana. A organização genética do gene que codifica AAF/III, designado *agg-3*, é muito similar ao de *aggA* e *aafA*. A frequência de AAF/III entre cepas EAEC é muito similar (12%) àquela de AAF/I e II (Bernier *et al.*, 2002).

Estruturas afimbriais, particularmente proteínas de membrana externa (OMP), também foram descritas em algumas amostras de EAEC. Assim, Debroy *et al.* (1995) descreveram uma OMP de 30kDa que estaria envolvida na aderência de uma amostra EAEC protótipo (sorotipo O4:H7). Chart *et al.* (1995) descreveram proteínas de membrana externa de 18kDa, em amostras dos sorotipos O126:H27 e O44:H18, as quais encontravam-se expostas na superfície bacteriana e são antigenicamente semelhantes, embora estruturalmente distintas. Os determinantes genéticos destas OMP ainda não foram descritos e seu papel como fator de colonização não foi firmemente estabelecido (Debroy *et al.* 1995).

Monteriro-Neto *et al.* 2003, descreveram uma proteína de membrana de 58 kDa, codificada por plasmídio e chamada de proteína agregativa 58 (Ap58). Segundo estes autores, esta proteína está envolvida na adesão e na hemaglutinação de EAEC a células animais.

A produção de diferentes tipos de toxinas também foi evidenciada em amostras de EAEC. Savarino *et al.* (1991) identificaram na amostra 17-2 a produção de uma proteína homóloga a enterotoxina termo-estável (STa), designada EAST1 (enterotoxina termo-estável de EAEC). EAST1 é uma proteína de 30 aminoácidos que contém 4 resíduos de cisteína, diferentemente de STa que contém 6 resíduos. Funcionalmente EAST1 é muito similar às toxinas termo-estáveis de ETEC. EAST1 aumenta os níveis de GMPc e causa aumento na corrente de curto circuito em modelo de Ussing-chamber, contendo mucosa intestinal de coelhos, sendo essas propriedades compatíveis com a produção de diarreia secretora. Ela é codificada pelo gene *astA*, localizado no plasmídio de aderência da amostra 17-2 (Savarino *et al.*, 1991). O papel de EAST1 na secreção observada em infecções por EAEC não foi determinado, uma vez que ela também é produzida por amostras incapazes

de causar diarreia e por outras categorias enteropatogênicas como ETEC, EHEC e EPEC (Savarino *et al.*, 1996; Yamamoto & Nakazawa, 1997).

Eslava *et al.* (1998) purificaram e caracterizaram uma proteína de 108 kDa a partir da cepa EAEC O42, a qual foi denominada Pet (“plasmid-encoded toxin”). Pet é uma toxina termo-lábil que induz aumento na diferença de potencial e na corrente de curto-circuito em preparações jejunais de rato montadas em câmaras de Ussing. Esses efeitos são acompanhados de uma diminuição da resistência elétrica nos tecidos tratados, aumento na liberação de muco, esfoliação celular e desenvolvimento de abscessos nas criptas. Em culturas de tecidos “in vitro”, Pet provoca perda do contato celular, seguido de arredondamento e destacamento das células do substrato (Navarro-Garcia *et al.*, 1999). Essa toxina tem homologia com a classe de proteínas autotransportadoras, caracterizadas pela presença de um domínio conservado na região C-terminal e que formam um poro de “ β -barrel” na membrana externa da bactéria, através do qual a proteína madura é transportada (Eslava *et al.*, 1998).

Henderson *et al.* (1999) identificaram no cromossomo da amostra EAEC O42, uma proteína semelhante àquela envolvida na colonização intestinal de *Shigella flexneri*. Esta proteína está presente no mecanismo tipo V de secreção das proteínas autotransportadoras, possuindo atividade mucolítica, resistência ao soro e hemaglutinante. Essa proteína foi denominada PIC (“protein involved in colonization”) e apresenta homologia com as proteínas autotransportadoras do subgrupo SPATEs (“Serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae*”).

Sheikh *et al.* (2002) caracterizaram uma proteína imunogênica de 10kDa em EAEC, produzida pelo gene *aap* localizado separado do controle do gene *aggR*. Essa proteína foi chamada dispersina, uma vez que é secretada durante o crescimento bacteriano e permanece associada à superfície bacteriana. A dispersina mostrou ter um importante papel na aderência e colonização bacteriana.

De uma forma geral, a patogênese de EAEC envolve três estágios, a saber:

1. Aderência inicial na mucosa pelas fímbrias agregativas e outros fatores de colonização,
2. Produção de uma camada de muco, provavelmente produzido pela bactéria e pela mucosa intestinal. EAEC adere na mucosa intestinal e estimula a secreção de muco (Huang & DuPont, 2004), formando uma espécie de biofilme. Este

biofilme incrusta na mucosa e facilita a permanência de EAEC na superfície dos enterócitos (Tzipori *et al.*, 1992; Hicks *et al.*, 1996). Isto pode ser a explicação para alguma das características clínicas da diarreia provocada por este grupo, que inclui presença de muco nas fezes e diarreia prolongada (mais de 14 dias) (Henderson *et al.*, 1999; Vial *et al.*, 1987).

3. Produção de toxinas com intensa resposta inflamatória. A resposta inflamatória acarreta a liberação de citocinas (principalmente a IL-8) que causam toxicidade na mucosa e secreção intestinal (Greenberg *et al.*, 2002).

Para Okeke & Nataro (2001), nenhum dos fatores de virulência de EAEC é encontrado em todas as amostras e muitos não são únicos dessa categoria. Isto demonstra a dificuldade para se estabelecer definição genotípica e/ou propor um modelo exato de sua patogenicidade.

1.1.6. *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC)

Cepas de *E. coli* pertencentes a esse grupo são identificadas pelo seu padrão de aderência difuso em cultura de células epiteliais “in vitro” (Scaletsky, *et al.*, 1984) e foram reconhecidas como a sexta classe de *E. coli* diarreiogênica (Nataro & Kaper, 1998).

Estudos recentes têm implicado cepas DAEC como agentes de diarreia (Gomes *et al.*, 1998; Levine *et al.*, 1993). Porém, em outros estudos, DAEC foi mais freqüente em pacientes assintomáticos do que em pacientes com quadros de diarreia. Uma associação de DAEC com diarreia foi achada em crianças com cerca de cinco anos de idade. Neste estudo foi mostrado que o risco relativo de diarreia associada a DAEC aumenta com a idade (Levine *et al.*, 1993). Na França, cepas DAEC foram altamente prevalentes em casos de diarreia em pacientes hospitalizados, não havendo outro enteropatógeno identificado, sugerindo que DAEC pode ser um importante patógeno em países desenvolvidos (Jallat *et al.*, 1993).

Várias estruturas envolvidas na virulência desse grupo são relatadas. De fato, quatro adesinas relacionadas com o fenótipo de aderência difusa estão bem caracterizadas: F1845 (Bilge *et al.*, 1989), AIDA-I (Benz & Schmidt, 1992), CF16k (Jallat *et al.*, 1994), e uma proteína de 57 kDa (Yamamoto *et al.*, 1996). Contudo, não há dados suficientes para confirmar o papel dessas adesinas na diarreia (Taddei *et al.*, 2003).

A fímbria F1845 foi caracterizada em 1989 como sendo responsável pela adesão difusa de amostras DAEC (Bilge *et al.*, 1989). O gene que codifica esta fímbria pode estar presente no cromossomo ou em plasmídios, sendo que esta fímbria mostra homologia com os membros da família Dr de adesinas (Nowicki *et al.*, 1990).

Benz & Schmidt (1992) descreveram um gene denominado *aida-I* que gera uma proteína de 100 kDa, sugerindo que este fator estaria associado ao fenótipo de aderência difusa e é expresso por um pequeno número de cepas DAEC. Tanto Aida-I como a F1845 podem ser usadas para a detecção de amostras DAEC, através da sonda *daaC*, um operon comum das Afa/Dr adesinas (Bilge *et al.*, 1989).

Yamamoto *et al.*, (1996) mostraram que uma cepa de *E. coli* não portadora da fímbria F1845, expressava uma proteína de 57 kDa, que seria a responsável pela aderência difusa e também pela capacidade de hemaglutinação.

Cepas DAEC induzem efeitos citopáticos caracterizados pelo desenvolvimento de longas extensões celulares que envolvem a bactéria aderida (Kaper *et al.*, 2004). Bernet-Camard *et al.* (1996) postularam que as injúrias às microvilosidades provocadas pela *E. coli* 1845 podem ser resultado da desorganização da rede do citoesqueleto celular. A interação da fímbria F1845 com DAF (receptor para C1845 – proteína ancorada ao GPI) (Caras *et al.*, 1987) pode promover a transdução de sinais que poderão induzir a distribuição de F-actina, resultando na lesão das microvilosidades. Essas alterações em muitas células podem resultar em diarreia (Bernet-Carmad *et al.*, 1996).

Um locus homólogo ao LEE (responsável por desencadear a lesão A/E) de EPEC e STEC foi encontrado em algumas cepas de *E. coli*, isoladas no Brasil e na Alemanha, que mostraram aderência difusa. Essas cepas DAEC exibiram propriedades características de EPEC, como a secreção de proteínas EspC (Beinke *et al.*, 1998).

A importância da categoria DAEC em infecções do trato urinário (UTI) também tem sido descrita (Nowicki *et al.* 2001). Estudos recentes mostram que algumas cepas DAEC carregam fatores de virulência encontrados em *E. coli* uropatogênica (UPEC) (Johnson & Stell, 2000).

Recentemente, Servin (2005) propôs uma nova classificação para *E. coli* que aderem difusamente em células. De acordo com este autor, DAEC podem ser divididas em típicas e atípicas. A classe típica incluiria cepas que carregam adesinas da família Dr com idêntica organização gênica, permitindo ligação ao DAF, enquanto a classe atípica

englobaria cepas que não só possuem adesinas Dr, mas também outros tipos de adesinas que promovem aderência difusa e que não possuem capacidade de ligação ao DAF.

Dados a respeito da relação entre cepas DAEC e diarreia permanecem, até o momento, controversos, e a patogenicidade entérica deste grupo ainda é questionável (Taddei *et al.*, 2003). Possivelmente, cepas DAEC constituem um grupo heterogêneo e muitos diferentes clones devem coexistir, todos exibindo fenótipo de aderência difusa em ensaios de cultura de células, enquanto somente uma sub-população destes microrganismos são patogênicos (Girón *et al.*, 1991b). Essa teoria pode explicar porque cepas DAEC são isoladas de fezes não diarreicas em estudos epidemiológicos (Jallat *et al.*, 1993).

Dentre esses diferentes grupos de *E.coli* diarreiogênicas, EPEC, EAEC, DAEC e, em menor frequência, EHEC, podem ser associados a padrões de adesão em culturas de tecidos ou em enterócitos “in vivo” (Scalestky *et al.*, 1984). Os padrões observados são:

1. Localizada (LA): As bactérias aderem-se em pequenos pontos na superfície celular como se fossem microcolônias, uma característica de EPEC e EHEC;
2. Localizada-Like (LAL): a adesão ocorre de forma mais frouxa do que no padrão anterior. Este padrão é visto em amostras de *E.coli* que possuem intimina sem a presença do plasmídeo EAF e do gene *bfp*.
3. Difusa (DA): a bactéria adere de forma não uniforme ao redor e na superfície da célula;
4. Agregativa (AA): a adesão bacteriana se mostra como tijolos empilhados, ocorrendo tanto no vidro como na superfície celular,
5. Não característico (NC): observa-se aparente mistura dos padrões acima descritos.

1.2 *Escherichia coli* e água

Embora exista um grande volume de informação sobre o isolamento de *E. coli* patogênicas ao homem e a animais, sua ocorrência no meio ambiente é pouco estudada. Entretanto, a importância da água e alimentos contaminados na veiculação desse patógeno tem sido registrada por vários autores (Mason & Richardson, 1981; Swedlow *et al.*, 1992; Tarr, 1995; U. S. Department of Health and Human Services, 1995; Besser *et al.*, 1997; Ohno *et al.*, 1997; Freedman *et al.*, 1998; Shere *et al.*, 1998).

E. coli é considerada o principal indicador da qualidade da água e de contaminação fecal, uma vez que uma série de patógenos pode ser veiculada através de fezes e requer ação imediata no que diz respeito o controle da qualidade das águas nos seus mais diversos usos: consumo humano, recreação, irrigação, aquacultura, e outros (Swerdlow *et al.*, 1992; “World Health Organization”, 1997).

Os habitats secundários para *E. coli*, como água, solo e sedimentos diferem dos habitats primários (intestino) em vários aspectos como, por exemplo, a oferta de nutrientes (maior no habitat primário), modo de respiração (aeróbica no habitat secundário e anaeróbica no primário), temperatura constante no habitat primário (ao redor de 37° C), e variável no secundário (Savageau, 1983).

Em média, *E. coli* sobrevive na água de consumo de 4 a 12 semanas, a uma temperatura de 15 – 18 ° C (Edberg *et al.*, 2000). Fransolet *et al.* (1985) observaram que o crescimento de *E. coli* e *Enterobacter aerogenes* é mais lento em temperaturas inferiores a 20 °C. LeChevallier *et al.* (1996) mostraram, em um estudo feito entre 1992 e 1993 nos Estados Unidos, que a presença de coliformes na água era maior entre junho e outubro, quando a temperatura é geralmente superior a 15°C. Já Wang & Doyle (1998) observaram que *E. coli* O157:H7, da categoria EHEC, sobrevive por mais tempo na água na temperatura de 8 °C do que a 25°C.

O número de bactérias na água pode aumentar devido a diversos fatores ambientais, como por exemplo, temperatura e o regime de chuvas, que carrega a bactéria de fezes depositadas nas margens ou em bancos de areia de represas e rios (Solo-Gabriele *et al.*, 2000). Badge & Rangari (1999) observaram a existência de variação sazonal de coliformes fecais no lago Upvan na Índia. A contagem de coliformes na água deste lago foi maior na época das chuvas.

Em 1845, após uma epidemia de cólera em Londres, foi que a transmissão de doenças entéricas foi relacionada à contaminação de água potável por esgotos (Bates, 2000) e, a partir de então, houve a reavaliação do sistema de distribuição e tratamento de água e esgoto (Edberg *et al.*, 2000).

Diversos casos de contaminação por *E. coli* em águas são relatados ao redor do mundo (Warner *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 2001; Agard *et al.*, 2002; Feldman *et al.*, 2002; Samadpour *et al.*, 2002), em países como Escócia, Estados Unidos e Trinidad e Tobago. Um destes casos ocorreu no estado americano de Missouri, onde 243 habitantes

apresentaram diarreia entre dezembro de 1989 e janeiro de 1990. A contaminação ocorreu pelo consumo de água municipal, a qual não estava tratada de maneira apropriada (Swerdlow *et al.*, 1992).

Em outro estudo, Feldman *et al.* (2002) concluíram que infecções por *E. coli* O157:NM, na Califórnia, no mês de agosto de 1999, estavam associadas à ingestão de água de um lago usado para recreação. No Japão, uma criança de 2 anos de idade apresentou diarreia e posteriormente diarreia com sangue, após consumir água de um poço com água não clorada. Análises com isolados de *E. coli* das fezes do paciente mostraram se tratar de uma linhagem VTEC O121 Stx-2 positiva (Yatsuyanagi *et al.*, 2002).

Ohno *et al.* (1997) estudaram bactérias enteropatogênicas no rio La Paz, na Bolívia, e observaram um aumento na quantidade de bactérias nos locais mais próximos à foz do rio, onde há maior concentração humana. Esses autores também isolaram bactérias enteropatogênicas ao longo do rio, das quais três isolados eram *Salmonella* do grupo O4, cinco *E. coli* do “virotipo” ETEC, compreendendo os sorogrupos (O44) e 2 EIEC pertencentes ao sorogrupo O29.

Yarse & Chase (2000) especularam que um período de seca seguido por forte chuva levou ao alagamento de um poço recém cavado, no estado de Nova Iorque, Estados Unidos, o qual teria sido contaminado por esterco de gado levado de um pasto localizado nas proximidades. Posteriormente, a água foi utilizada para a fabricação de gelo e refresco. Duas semanas depois, ocorreu uma epidemia envolvendo aproximadamente 1000 pessoas com diarreia, sendo que duas morreram devido à síndrome hemolítica-urêmica, causada pela linhagem O157:H7, da categoria VTEC. Na Escócia, Licence *et al.* (2001) encontraram evidências de que uma fonte de água foi responsável pela contaminação de 6 pessoas.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a água deve ser examinada com regularidade, já que a poluição é geralmente intermitente e pode não ser detectada caso os exames sejam realizados em uma única ou em um pequeno número de amostras (Chalmers *et al.*, 2000).

Atualmente, cerca de 2,4 bilhões de indivíduos vivem em locais sem saneamento básico e aproximadamente 250 milhões de pessoas são infectadas, por ano, com algum patógeno através da água, resultando em 4 milhões de morte, principalmente, nos países em desenvolvimento (World Health Organization 2002a).

1.3 Avaliação da água

Um dos métodos mais comuns para verificar a qualidade da água é a contagem do número de colônias de coliformes fecais visíveis em meio seletivo (World Health Organization, 2002b).

O grupo coliformes é composto por organismos Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, capazes de fermentar lactose, produzir gás e ácidos e sintetizar a enzima β -D-galactosidase (Edberg *et al.*, 2000). Por esta classificação são considerados coliformes linhagens dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*. Dentre os representantes desses gêneros, apenas *Escherichia coli* está necessariamente associada à contaminação fecal, por isso, dentre os coliformes, é a espécie mais utilizada como indicador da qualidade sanitária da água destinada ao consumo humano (Edberg *et al.*, 2000).

Embora a utilização de coliformes como indicadores torne a avaliação da água mais rápida, é preciso observar que os diferentes microrganismos presentes em um ambiente aquático podem apresentar graus diferentes de sensibilidade ao tratamento (Toze, 1999). O método de avaliação também deve permitir o conhecimento do número de patógenos presentes na amostra, uma vez que para o início de infecções bacterianas são necessárias cerca de 10^3 células e para infecções causadas por vírus entéricos ou *E.coli* O157:H7 apenas 10 partículas infecciosas são suficientes, por essa razão, mesmo em baixas concentrações, a presença destes microrganismos é preocupante. Rivera & Martins (1996) discutem ainda se a ausência de coliformes fecais indicaria segurança em relação a vírus e protozoários patogênicos

No ambiente, além da integridade e do estado fisiológico das células bacterianas, outros fatores como temperatura, luminosidade, salinidade, chuvas, concentração de nutrientes e poluição ambiental afetam a eficiência dos métodos de detecção e quantificação dos microrganismos (Solo-Grabiele *et al.*, 2000).

A água para ser consumida pelo homem não pode conter substâncias dissolvidas em níveis tóxicos e nem transportar em suspensão microrganismos patogênicos. Como uma forma de controlar a quantidade dessas substâncias foi necessário estabelecer um padrão de potabilidade e estipular parâmetros de análise, definindo um valor ou concentração a partir do qual seu consumo pode induzir riscos à saúde. Os parâmetros utilizados para analisar a

água destinada ao consumo humano são físico-químico, organolépticos e microbiológicos (Análise da água, 2004). A análise do parâmetro microbiológico deve-se ao fato de que a água normalmente é habitada por vários tipos de microrganismos de vida livre e/ou parasitária, sendo necessária a identificação e quantificação destes (Macedo, 2001).

No Brasil, as normas são definidas pela portaria 1469 de 29/12/2000- Ministério da Saúde, capítulo IV -padrão de potabilidade. Estas definem que água para consumo humano deve ser livre de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes com ausência em 100mL ou positividade de até 5% para coliformes totais.

1.4 Captação e fornecimento de água para consumo humano no município de Ouro Preto-MG

O município de Ouro Preto possui um sistema atual de fornecimento de água com 22 captações, sendo a maioria proveniente de águas subterrâneas, superficiais, minas, nascentes e fontes. Existem ainda pequenas captações particulares ou de uso coletivo em bairros da periferia e chafarizes públicos que datam da época colonial e dos quais se abastece ainda parte da população. Na zona rural, as populações se abastecem principalmente a partir dos mananciais de superfície, nascentes e fontes (Cruz, 1994).

De acordo com observações de Las Casas (1994) e informações obtidas no Departamento de água e esgoto da Prefeitura local o sistema municipal de abastecimento de água de Ouro Preto não é satisfatório, tendo sido implantado na década de 1940 e seu estado de conservação é ruim. O abastecimento é administrado pela própria prefeitura, não havendo pagamento do uso da água pela população. Segundo informações obtidas no Departamento de Água e Esgoto da Secretaria de Obras Municipal, o único tratamento que a água recebe antes de ser consumida é a cloração, quando recebe.

Sabioni (2001) e Neves *et al.* (2002b) pesquisando a água de consumo no município de Ouro Preto, verificaram que um grande número de residências, e às vezes em todo um bairro, são utilizados mananciais próximos, como minas e nascentes entre outros, como forma de obtenção de água para o consumo, devido à ineficiência do sistema de abastecimento de água potável municipal.

Em 2002 procedeu-se a investigação da qualidade da água de consumo nos bairros da periferia de Ouro Preto, sendo averiguado que 70% das amostras coletadas estavam contaminadas por coliformes fecais (Neves, 2002). As espécies bacterianas isoladas foram

identificadas e amostras de *E. coli* foram identificadas utilizando-se soros comerciais. Em paralelo realizou-se diagnóstico dos casos de diarreia infantil de moradores dos locais de coleta das águas e foi detectada presença dos tipos patogênicos de *E. coli* enterotoxigênica, enteropatogênica e enteroinvasora (Pereira, 2003). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997), a presença de coliformes em uma proporção alta de amostras de água é um bom indicador de contaminação de água, o que implica em risco para saúde humana no que tange as epidemias humanas de origem hídrica.

Em 1993, a etiologia da diarreia infantil na cidade de Ouro Preto - MG também foi investigada, sendo observada alta prevalência de diarreias em relação a outras doenças infantis. Em tal estudo, procedeu-se a investigação de vários agentes diarreio gênicos nas fezes de quatrocentas crianças com diarreia na faixa de 0 a 5 anos. Os seguintes agentes foram investigados: rotavírus, adenovírus, espécies de *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* e *E.coli*, além de protozoários como *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. Os agentes que apresentaram maior incidência nas diarreias nos pacientes de baixo nível sócio-econômico, assim como no estudo de 2002, foram os tipos patogênicos de *E. coli* enterotoxigênica, enteropatogênica e enteroinvasora (Lanna, 1993).

A constatação da presença de *E. coli* diarreio gênica na água de consumo da população de Ouro Preto tanto no levantamento epidemiológico de 1993, quanto no estudo de 2002, torna relevante o estudo possíveis fatores de virulência nas amostras isoladas, podendo, desta maneira, contribuir para alertar a população do risco que o consumo desta água oferece e prevenir futuros surtos de diarreia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar fenotípica e genotipicamente fatores de virulência em amostras *Escherichia coli* isoladas de água de consumo da cidade de Ouro Preto-MG.

2.2 Objetivos Específicos

Pesquisar na amostras de *E. coli*:

1. A produção de hemolisina;
2. A presença das fímbrias tipo 1, K88, F41, 987p, AAF/I, AAF/II e dos fatores de colonização de ETEC (CFA I e CFA II).
3. O padrão de adesão em células HEp-2.
4. A produção e caracterização de citotoxinas nas linhagens de células Vero, HeLa e CHO;
5. A produção de enterotoxinas.
6. A presença de genes que codificam para toxinas: STx1, STx2, STx2v, LT1, LT2, STa, STb, EAST-1, Pet, Pic, Sat, CNF1, CNF2, CDT, α Hly e EHly.
7. A presença dos genes *bfp*, *eae*, e dos plasmídeo EAF e Inv.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras Bacterianas

Nesse trabalho foram estudadas 97 amostras de *Escherichia coli* isoladas de água de consumo da cidade de Ouro Preto, MG, do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ouro Preto, MG, no período de janeiro de 2002 a fevereiro de 2003. A identificação das amostras de *E. coli* foi realizada através de série bioquímica empregando os meios de EPM (Toledo *et al.*, 1982 a), MILi (Toledo *et al.*, 1982 b), Citrato de Simmons (Edwards & Ewing, 1972). Estas amostras foram mantidas em ágar nutriente a temperatura ambiente.

As amostras padrão empregadas neste estudo encontram-se descritas na Tabela 1.

3.2 Estudo fenotípico das amostras de *E. coli*

3.2.1. Detecção de Hemolisinas

3.2.1.1. No meio sólido

As amostras de *E.coli* foram pré-cultivadas em 3mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth – Oxoid) durante 18 horas, a 37° C com agitação (150 rpm) e foram semeados por picada em ágar sangue com 5% de sangue desfibrinado de boi, carneiro, cavalo, cobaia e humano, não lavado e lavado três vezes com PBS 0,15 M pH 7,4. A presença de halos de hemólise ao redor das colônias foi observada após quatro, 18 e 48 h de incubação a 37 ° C. Os controles positivo e negativo são citados na Tabela 1.

3.2.1.2. Em sobrenadantes das culturas

Para verificar atividade hemolítica nos sobrenadantes, alíquotas dos extratos de cultura de *E. coli*, obtidas conforme descrito no item 3.2.7.1, foram diluídas sucessivamente, na razão 2, em PBS 0,15M pH 7,4. Para cada 50µL de sobrenadante da cultura diluído foram adicionados 50µL de hemácias de carneiro ou cavalo a 1%, previamente lavadas três vezes no mesmo PBS. A hemólise foi determinada visualmente e através da medida da absorbância no sobrenadante a 540 nm, após 60 minutos de incubação em banho de água a 37 ° C. O título foi definido como a recíproca da maior diluição capaz de provocar a lise de 50% das hemácias. As amostras utilizadas como controles, positivo e negativo, são citadas na Tabela 1.

Tabela 1. Amostras padrão de *Escherichia coli* para fatores de virulência pesquisados fenotípica e genotipicamente no presente estudo.

Designação da amostra	Fator de Virulência
P-46	α -hemolisina
P-17	LT-I, STb
Pc/c LT-II	LT-II
152-2	STxT1, STx2
S119112	STx2v
B41	Sta e F41
CLDT7	CDT
FVL2	CNF1 e 2
FV171	EAST1
C3888	ehly
042	Pet, Pic, AAF/II
17-2	AAF/I
FBC 114	Sat
2348/69	<i>eae</i> e <i>bfp</i> , aderência localizada
FV176	EAF
ORN 115	fimH
H56 K88ad	K88
603A	987p
FVL8	papC e papGII
J96	papGI e GII
FVL2	aerobactina
LG 1522	Indicadora de aerobactina
LG 1315	Aerobactina (teste fenotípico)
1294	Aderência Agregativa
304-4	Aderência difusa
DH5 α	Negativo

3.2.2. Detecção de aerobactina

A pesquisa de aerobactina foi realizada segundo Carbonetti *et al.*, 1986. As amostras de *Escherichia coli* positivas pelo teste genotípico para o gene *iucD* (11 amostras) foram cultivadas em Meio Mínimo M9 líquido, suplementado com 200µM de quelante de ferro α - α' dipiridil (Sigma). As amostras foram incubadas a 37°C por 24h sob agitação a 150 rpm. A linhagem indicadora de aerobactina *E. coli* LG 1522 foi cultivada em meio LB por 24 h a 37° C e depois semeada por espalhamento em placas contendo o meio anteriormente citado acrescido de ágar. As placas foram secas a 37°C, durante 15 minutos e as amostras em estudo foram semeadas por “spot”. A linhagem LG 1315 foi utilizada como controle positivo, como apresentado na Tabela 1.

3.2.3. Detecção da atividade hemaglutinante

A detecção da atividade hemaglutinante foi realizada segundo a metodologia proposta por Evans *et al.* (1980) Amostras de *E. coli* foram cultivadas em BHI a 37°C. Após 18h, as culturas bacterianas foram semeadas em ágar CFA (Colonization Factor Ágar). O crescimento bacteriano foi suspenso em PBS 0,15 M pH 7,4e ajustado para a escala 3 de Mac Farland. A hemaglutinação foi realizada em lâmina espelhada, em banho de gelo. Foram usados 50µL da suspensão bacteriana e 50µL da suspensão a 1% de hemácias de cobaia, cavalo, galinha, bovina e humano dos grupos A e O. A detecção da atividade hemaglutinante foi realizada na presença e ausência de D-manose a 1%.

Após homogeneização, as amostras foram classificadas nos padrões de hemaglutinação MSHA (hemaglutinação manose sensível) e MRHA (hemaglutinação manose resistente).

3.2.4. Teste de adesão em células HEp-2

3.2.4.1. Preparo das amostras bacterianas

As amostras bacterianas foram cultivadas em meio LB por 18 horas a 37° C. Uma alíquota de 100µL da cultura bacteriana foi centrifugada e lavada três vezes com PBS esterilizado. As células bacterianas foram ressuspensas em 100µL de PBS. As amostras padrão utilizadas são mencionadas na Tabela 1.

3.2.4.2. Preparo das células HEp-2

As células foram preparadas conforme o item 3.2.7.2 e cultivadas em microplacas de 24 câmaras com lâminulas, contendo 1 mL de meio Eagle (MEM).

3.2.4.3. Adesão às células HEp-2

Após a formação da monocamada, o meio foi descartado e a microplaca foi lavada três vezes com PBS estéril 0,15M pH 7,4 e em cada câmara foi adicionado 1mL de MEM acrescido de 2% de SFB (Soro Fetal Bovino), com e sem 1% de D-manose. Em seguida, foram adicionados 40µL de cada amostra bacteriana por câmara. A microplaca foi incubada por 3 horas a 37°C e, após este período lavada 10 vezes com 1 mL de PBS 0,15M pH 7,4 por câmara para retirada das bactérias não aderidas. As lâminulas foram fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com May- Grünwald (5 minutos) e Giemsa (20 minutos) e observadas em microscópio óptico em objetiva de imersão. Para definir o tipo de adesão foram utilizados os critérios descritos por Nataro *et al.*, (1987) e Levine (1987).

3.2.5. Produção e quantificação de biofilme

Para avaliar e quantificar a formação de biofilme foi utilizada a metodologia proposta por Wakimoto *et al.* (2004). Foram inoculados 5 µL do crescimento bacteriano, obtidos em meio LB a 37° C por 18h sob agitação, em placa de 96 concavidades contendo 200 µL de meio Eagle com 0,45% de glicose. As amostras de *E. coli* foram incubadas por 18h a 37° C e, após este período, o meio foi descartado e acrescentados 200 µL de cristal violeta a 5 % por 5 minutos, seguido de lavagem com água destilada e acréscimo de 200 µL de etanol 95% em cada concavidade. Foi realizada leitura a 570 nm em espectrofotômetro. O teste foi considerado positivo quando a cor azul era visível, e/ou apresentava valores maiores ou iguais a 0,2 pela medida da absorbância. A amostra de *E. coli* 042 foi utilizada como controle positivo.

3.2.6. Pesquisa da produção de película

A pesquisa da produção de película foi realizada conforme descrito por Albert *et al.* (1993). As amostras bacterianas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo caldo LB e, a seguir, foram incubadas por 20h a 37°C com aeração (100 rpm). A produção de película foi observada como sendo a formação de um agregado bacteriano na superfície do meio líquido. Foi utilizada como controle positivo a amostra de *E. coli* 042.

3.2.7. Teste de citotoxicidade

3.2.7.1. Preparo dos sobrenadantes de cultura bacteriana

As amostras de *E. coli* foram cultivadas em cinco meios diferentes para determinar a melhor produção de citotoxina e de hemolisina. Os meios utilizados foram: TSB (Tryptic Soy Broth – Oxoid), BHI (Infuso cérebro coração), CN (caldo Nutriente), LB (Lúria Bertani) e MM (Meio Mínimo). O cultivo foi realizado sob agitação a 150 rpm, com e sem adição de mitomicina C (25 µL) e polimixina B (0,2 mg/mL), a 37°C por 18h. As culturas bacterianas foram centrifugadas a 12.000 x g, 15 min a 4°C e os sobrenadantes foram coletados e mantidos a 4° C até a realização dos testes. Foram utilizadas as amostras padrões para as toxinas STx1, STx2, STx2v, LTI, LTII, CDT, CNFI, CNFII, α-Hly, eHly, Sat, Pet, Pic, conforme mostrado na Tabela 1.

3.2.7.2. Preparo das linhagens celulares

As células Vero (células de rim de macaco verde africano), HeLa (Carcinoma de útero), CHO (Ovário de Hamster Chinês) e HEP-2 (Carcinoma de laringe humana) foram descongeladas em banho de água a 37°C e transferidas para uma garrafa de cultura de células contendo Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado (MEM/Cultilab), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB/Cultilab) e 1% de solução de antibióticos contendo penicilina (1000 U/mL; Sigma) e estreptomicina (250 µg/mL; Sigma). Os frascos de cultura foram incubados em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 48 horas até a formação da monocamada celular. Após este período o meio foi descartado sendo adicionado à cultura celular uma solução de AVT (Associação Tripsina-

Versene/Cultilab) para descolamento da monocamada. As células foram ressuspensas no meio MEM acrescido de 10% de SFB e 1 % de antibióticos, para um número estimado de $2,5 \times 10^5$ células /mL. A suspensão de células foi distribuída em microplacas de 96 cavidades, em volume de 100 µL por cavidade. As microplacas foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ (Juan, França) por 24 horas.

3.2.7.3. Detecção da atividade citotóxica

O meio de cultura celular foi removido e 100 µL de MEM com 50µL gentamicina (80 µg/mL) foram adicionados. Sobrenadantes das culturas bacterianas obtidos foram adicionadas em duplicata, em diluições seriadas na razão dois até a diluição de 1:512. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e a leitura foi acompanhada após 2, 4, 6, 18, 24, 48 e 72 horas de incubação com auxílio de um microscópio invertido (Nikon Instruments, Japão).

3.2.8. Ensaio de termoestabilidade da atividade citotóxica

Para verificar a termoestabilidade, 1 mL dos sobrenadantes de cultura de *E. coli* foram distribuídos em tubos eppendorf e incubados em banho de água, controlado termostaticamente por 30 minutos nas temperaturas de 65° C e 100° C. A atividade citotóxica foi avaliada em cultura de células HeLa, Vero e CHO e pelo teste do camundongo recém-nascido.

3.2.9. Teste do camundongo recém-nascido

A enterotoxicidade do sobrenadante de cultura de *E. coli* foi avaliada pelo teste de camundongos recém-nascidos, seguindo a metodologia descrita por Dean *et al.* (1972). Foi administrado por via intragástrica a camundongos com 3 dias de vida, 100µL do sobrenadante de cultura, tratados e não tratados termicamente a 100°C por 30 minutos, contendo azul de Evans (Sigma), sendo utilizado quatro camundongos para cada amostra. Os camundongos foram mantidos à temperatura ambiente por 3 horas. Os animais foram sacrificados com éter e o grau de acúmulo de fluído intestinal foi determinado pela taxa de peso do intestino dividido pelo peso da carcaça (PI/C). Foi considerado como resultado positivo quando esta relação apresentava valores iguais ou superiores a 0,08.

3.3 Caracterização genotípica das amostras de *E. coli*

3.3.1. Obtenção do DNA para a reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras foram cultivadas em meio BHI, a 37°C por 24 horas. Após este período, foram semeadas em ágar TSA a 37°C por 24 horas. Um raspado de cada amostra foi ressuspensionado em 100 µL de água deionizada estéril. As suspensões bacterianas foram fervidas por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 rpm por 2 minutos. Os sobrenadantes destes materiais foram utilizados para a reação de PCR (Blanco *et al.*, 1997a).

3.3.2. Reação em cadeia da polimerase

A reação de PCR foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para cada um dos genes de *E. coli* já descritos na literatura: *stx1* e *stx2* (Shiga toxinas ou verotoxinas), *stx2v* (shiga toxina variante), *eltIA* e *eltIIB* (toxinas termolábeis de *E.coli*), *stIA* e *stIB* (toxinas termoestável), EAST1 (toxina termo-estável de EAEC), *cdtB* (toxina citolética distensora), *cnfs* (fator necrosante citotóxico) e *hlyA* (proteína estrutural hemolítica), *ehly* (enterohemolisina), *sat* (proteína autoreansportadora secretada), *pet* (toxina codificada por plasmídeo), *pic* (toxina envolvida na colonização de EAEC) *bfp* (Bundle-forming-pilus), *eae* (proteína intimina), EAF (EPEC adherence factor), pINV (plasmídeo de invasão), *iucD* (oxigenase responsável pela biossíntese da aerobactina), *fim H* (adesina da fímbria tipo 1), *papC* (proteína da membrana externa da fímbria P), *papGI/GII/GIII* (alelos da adesina papG), *kps MTII* (montagem do grupo capsular K1-K5), AFF/I e AFF/II (Fímbrias de aderência agregativa I e II), K88 e 987P (fímbrias de colonização de ETEC, associada a suínos). A sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados estão especificados no Quadro 1. Os reagentes utilizados para as reações de PCR com cada um dos genes mencionados estão indicados no Quadro 2.

Quadro 1. Sequências de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores para ensaios de PCR, temperatura de anelamento e tamanhos (pb) expressos na amplificação.

Gene	Sequência (5' → 3')	PA (pb) ^a	(ng/μL) ^b	TA ^c	REF
<i>stx1</i>	CGC TGA ATG TCA TTC GCT CTG C CGT GGT ATA GCT ACT GTC ACC	364	90	53	Blanco <i>et al.</i> , 1997b
<i>stx2</i>	CTT CGG TATA CCT ATT CCC GC CTG CTG TGA CAG TGA CAA AAC GC	515	60	53	Blanco <i>et al.</i> , 1997b
<i>eltIA</i>	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC	696	300	47	Schultsz <i>et al.</i> , 1994
<i>eltIIA</i>	TAT ATT GAT GAT GCA TAT GTA TC TAA CCC TGC AAT TAA ATC TC	300	300	48	Schultsz <i>et al.</i> , 1994
<i>stI</i>	TCC GTC AAA CAA CAT GAC GC ATA ACA TCC AGC ACA GGC AC	176	60	50	Blanco <i>et al.</i> , 1994
<i>stII</i>	GCC TAT GCA TCT ACA CAA TC TGA GAA ATG GAC AAT GTC CG	278	150	50	Ojeniyi, <i>et al.</i> , 1994
<i>cdtB</i>	TAT GAT AGC CTC TTT TAT CGT CGT CTG AGA GGA GAG TTA GAG CCT ATG ATA GCC TCT	805	60	45	Pickett <i>et al.</i> , 1996
<i>cnf-s</i>	CTG GAC TCG AGG TGG TGG CTC CTG TCA ACC ACA GCC	533	90	63	Blanco <i>et al.</i> , 1994
<i>hlyA</i>	AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A	1117	60	63	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>Enhly</i>	AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC	534	90	50	Paton & Paton, 1989b
<i>sat</i>	GTT GTC TCT GGC TGT TGC AAT GAT GTT CCT CCA GAG C	501	60	55	Este estudo
<i>pic</i>	GGG TAT TGT TCC GTT CCG AT ACA ACG ATA CCG TCT CCC G	1180	60	55	Okeke <i>et al.</i> , 2004
<i>pet</i>	ACT GGA AGG TGA AAA CAA CC GCA TGG CTG TCG GTA TAG GT	501	60	53	Este estudo
<i>astA</i>	CCA TCA ACA CAG TAT ATC AGA GGT CGC GAG TGA CGG CTT TGT	111	90	50	Yamamoto & Echeverria, 1996
<i>bfp</i>	CGT CTG ATT CCA ATA AGT AGC GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	326	60	53	Sohel <i>et al.</i> , 1996
<i>eae</i>	ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG	512	60	63	Gunzburg <i>et al.</i> , 1996
EAF	CAG GGT AAA AGA AAG ATG ATA A TAT GGG GAC CAT GTA TTA TCA	397	150	50	Gunzburg <i>et al.</i> , 1996
INV	GCT GGA AAA ACT CAG TGC CT CCA GTC CGT AAA TTC ATT CT	424	60	55	Beutin <i>et al.</i> , 1997
<i>icuD</i>	TAC CGG ATT GTC ATA TGC AGA CCG T AAT ATC TTC CTC CAG TCC GGA GAA G	602	60	63	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995.
<i>fimH</i>	TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA	508	60	63	Johnson & Stell, 2000
<i>aagA</i>	ATG ATT GTC CTG TTA CTA TAG C ATC ATT CTA TAT TCG CCT GGT A	352	60	60	Tsai <i>et al.</i> , 2003
<i>aafA</i>	TTC AGG TCA GAA CGT ATC GC CAG GTC GAT ATT TGC GCT	307	60	60	Tsai <i>et al.</i> , 2003
<i>papC</i>	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G CAT TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	328	60	63	Daigle <i>et al.</i> , 1994
<i>papGI</i>	CCAA CCT GCT CTC AAT CTT TAC TG CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT	692	60	63	Karkkainen <i>et al.</i> , 1998
<i>papGII</i>	GGA ATG TGG TGA TTA CTC AAA GG TCC AGA GAC TGT TCA AGA AGG AC	562	60	63	Karkkainen <i>et al.</i> , 1998
<i>papGIII</i>	CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT TCC AGA GAC TGT GCA GAA GGA C	421	60	63	Karkkainen <i>et al.</i> , 1998
K 88	ATC GGT GGT AGT ATC ACT GC AAC CTG CGA CGT CAA CAA GA	601	300	60	Franklin <i>et al.</i> , 1996
987p	TCT GCT CTT AAA GCT ACT GC AAC TCC ACC GTT TGT ATC AG	333	30	50	De Graaf & Klassen, 1997
<i>kpsMTII</i>	GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG CAT CAG ACG ATA AGC ATG AGC A	272	60	63	Johnson & Stell, 2000

^{a)} tamanho do produto amplificado; ^{b)} concentração do iniciador; ^{c)} Temperatura de anelamento do iniciador.

Quadro 2. Reagentes e concentrações utilizados nos ensaios de PCR.

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
10 x “PCR buffer” (Biotools)	3	1x
10 mM “dNTP mixture” (Biotools)	0,6	0,2mM de cada dntp
Iniciador 1	-	Quadro 1
Iniciador 2	-	Quadro 1
50 mM MgCl ₂	1,2	2,0
DNA extraído	7	-
Taq-DNA polimerase (5U)	0,2	1,0U
Água deionizada q.s.p 30 µL	variável	-
Total	30	-

Todas as reações foram submetidas a 30 ciclos que com as seguintes etapas:

Desnaturação inicial: 94° C por 5 minutos; desnaturação: 94° C por 1 minuto; anelamento: temperatura variável para cada primer (2 minutos); extensão: 72° C por 2 minutos.

3.3.3. Eletroforese em gel de agarose

Para a leitura do resultado das amplificações, 5 µL do tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol; 25% de ficol) foi misturado ao produto da reação. Foram aplicados 10 µL da mistura no poço preparado em gel de agarose 2% (Amersham Pharmacia Biotech/Suécia), em tampão T.A.E (Tris 2M, ácido acético 0,04M, EDTA 0,01M pH8). A visualização do produto de amplificação foi realizada após incubação em solução de brometo de etídeo (1,5 µg/mL) por 15 minutos, em transiluminador de luz UV.

4. RESULTADOS

4.1 Estudo Fenotípico das amostras de *E. coli*

4.1.1. Detecção de hemolisinas

4.1.1.1. Teste de hemólise em placa de ágar-sangue

Das 97 amostras estudadas, 50 (52,1%) apresentaram halo de hemólise ao redor do cultivo bacteriano quando se utilizou hemácia de cavalo. O ágar sangue preparado com hemácias lavadas não alterou o padrão de hemólise em nenhuma amostra. A Figura 1 mostra os resultados encontrados para as diferentes hemácias testadas.

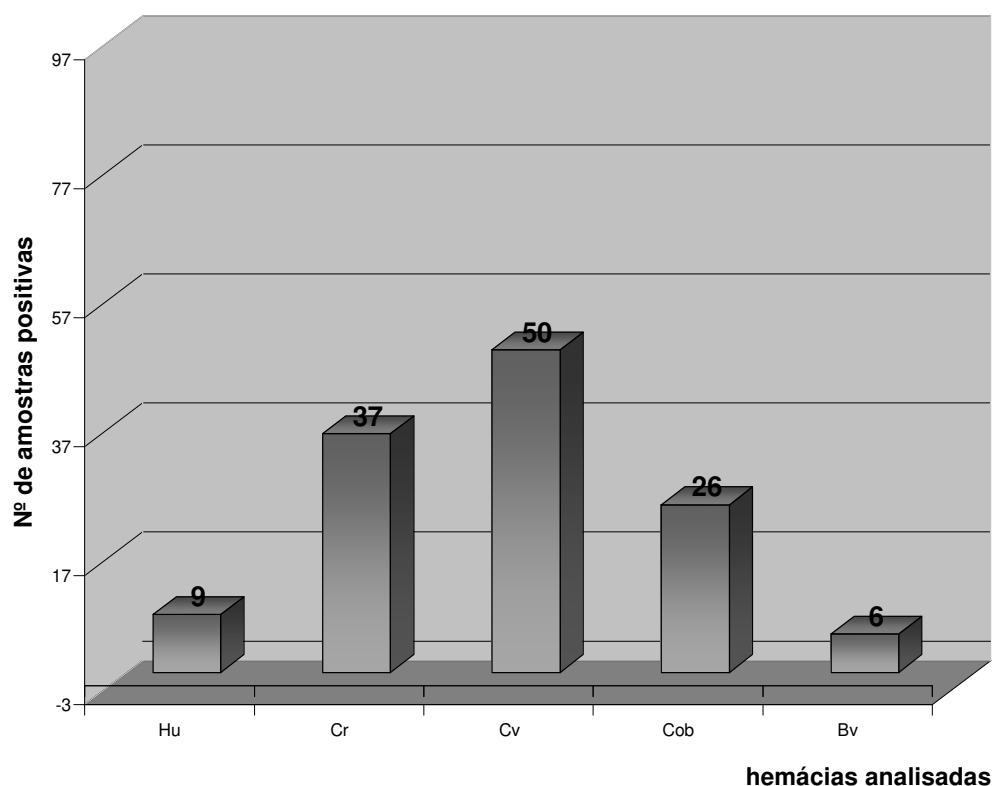


Figura 1 – Número de amostras de *E. coli* com atividade hemolítica, em placas de ágar sangue, preparadas com hemácias humanas (Hu); de carneiro (Cr); de cavalo (Cv); de cobaia (Cob) e hemácias bovinas (Bv).

4.1.1.2. Atividade hemolítica no sobrenadante de cultura

A atividade hemolítica no sobrenadante foi testada apenas com as amostras de *E. coli* que apresentaram halo de hemólise em placas de ágar sangue preparadas com hemácias de cavalo. Os sobrenadantes destas amostras não apresentaram atividade hemolítica através da metodologia empregada neste estudo.

4.1.2. Detecção de aerobactina

As 11 amostras positivas para o gene *iucD* (oxigenase responsável pela biossíntese da aerobactina) na reação em cadeia da polimerase (PCR) foram ensaiadas para a produção da aerobactina, sendo que todas foram positivas para o teste em questão.

4.1.3. Detecção da atividade hemaglutinante

Entre as noventa e sete amostras estudadas no presente trabalho, 70 (72%) aglutinaram hemácias de cobaia, sendo que todas tiveram a aglutinação inibida na presença de D manose, ou seja, apresentaram perfil MSHA (hemaglutinação manose sensível). Sessenta e quatro amostras (65,9%) aglutinaram hemácias de cavalo e também apresentaram perfil MSHA. Cinco (5,2%) foram positivas para a hemaglutinação com hemácias humanas do grupo A, também apresentando inibição pela manose e 20 (20,6%) hemaglutinaram hemácias humanas do grupo O. Uma amostra, do total que aglutinaram hemácias do grupo O, apresentou aglutinação manose resistente, mostrando perfil MRHA.

4.1.4. Teste de adesão em células HEp-2

Dentre o total de amostras estudadas neste trabalho, 49 (50,5%) apresentaram perfil de adesão agregativo (AA). Variação do padrão de adesão agregativo foi observada, sendo que, 18 amostras, entre as 49, aderiram de forma agregativa somente nas lâminas e 31 aderiram tanto na superfície celular quanto na lâmina de vidro. Conforme Nereida *et al.* (2000), denominou-se a adesão agregativa em lâminas de AAcS. Três amostras (6,1%) dentre as amostras AA tiveram adesão inibida na presença de D-manose e uma aderiu-se de forma não-característica na presença deste açúcar. Dezesseis amostras (16,5%) apresentaram perfil de adesão difusaa, sendo que variações desse padrão também foram

observadas: em um grupo de cinco amostras (31,3% %) a adesão difusa das células bacterianas ocorreu somente ao redor e na superfície celular e foram coletivamente agrupadas em aderência difusa do tipo 1 (AD1); em outro grupo de 11 amostras (68, 8%) aderiram de forma difusa tanto na célula quanto na lâmina, sendo chamadas de amostras produtoras do perfil de adesão difuso do tipo 2 (AD2). Essas denominações foram dadas de acordo com Yamamoto *et al.* (1997). Apenas duas amostras (2,1%) apresentaram adesão do tipo localizada-like (LAL), 12 amostras (12,4%) aderiram em padrões diferentes dos descritos pela literatura e foram classificadas como não-característica (NC) e 18 amostras (18,6%) de *E. coli* não aderiram nas células HEp-2, sendo, portanto, não aderentes (NA). A frequência dos diferentes padrões encontrados entre as 97 amostras em estudo está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Números e porcentagens de amostras de *Escherichia coli* positivas em células HEp-2 para testes de adesão.

Padrão de aderência em células HEp-2	Número de amostras (%)
Aderência agregativa	31 (31, 9)
Aderência agregativa em lamina	18 (18, 5)
Aderência difusa do tipo 1	5 (5, 2)
Aderência difusa do tipo 2	11 (11, 3)
Aderência “localizada like”	2 (2, 1)
Aderência não característica	12 (12, 5)
Não aderente	18 (18, 6)
Total	97 (100%)

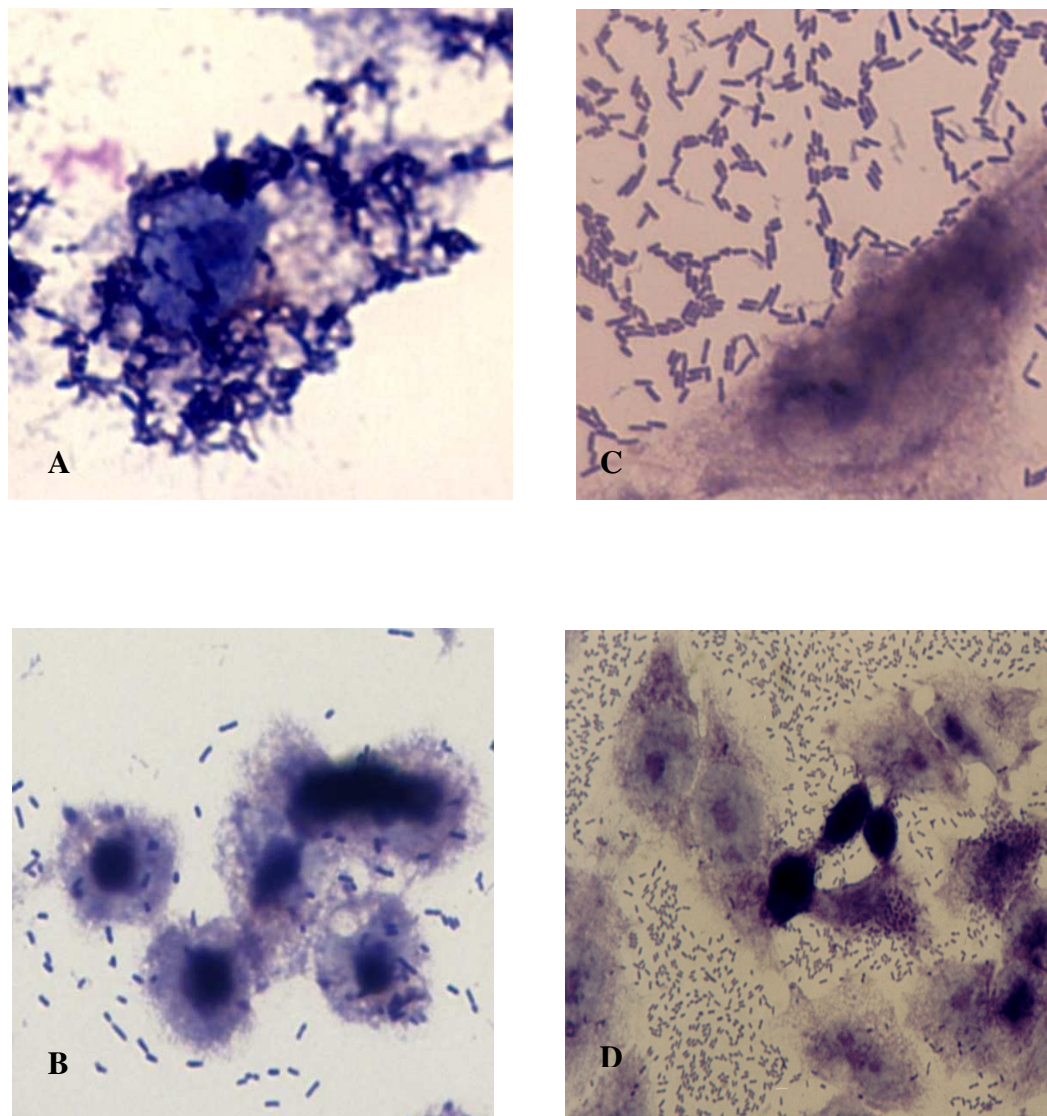


Figura 2. Padrões de adesão de amostras de *E.coli* em células HEp-2. A) Adesão difusa do tipo 1 (AD1); B) Adesão difusa do tipo 2 (AD2); C) Típica adesão agregativa (AA); D) Adesão agregativa com predominância de células bacterianas aderidas ao vidro da lâmina (AAs). Magnificação: 400x (A, B, C), 200x (D).

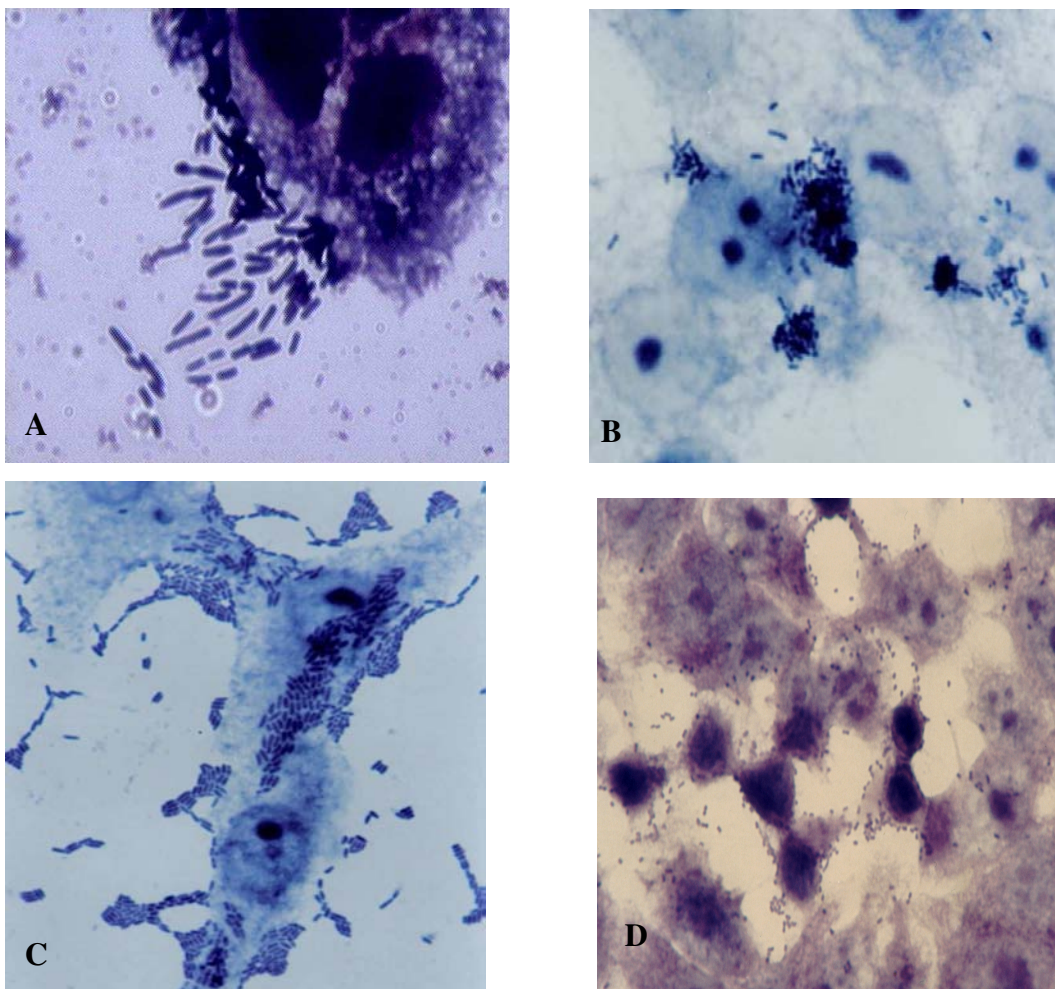


Figura 3. Padrões de adesão de amostras de *E.coli* em células HEp-2. A) adesão “localizada-like” observada em *E. coli* de água portadora do gene *eae*; B) Amostra de *E. coli* 2348-69, padrão positivo de adesão localizada; C) Amostra de *E. coli* 1294, controle positivo de adesão agregativa; D) Amostra de *E. coli* 304-4, controle positivo de adesão difusa. Magnificação: 400X (A), 200x (B, C), 100x (D).

4.1.5. Produção e Quantificação de Biofilme

A Figura 4 mostra a formação de biofilme por algumas amostras de *E. coli*. O controle positivo, *E. coli* 042, mostrou forte formação de biofilme com leitura da absorbância a 570 (OD₅₇₀) igual a $0,4 \pm 0,034$, enquanto o controle negativo DH5 α não mostrou formação de biofilme. As amostras analisadas mostraram valores de absorbância que variaram entre 0,1 a 0,4. As amostras de *E. coli* foram, então, classificadas em três grupos baseado nos valores de absorbância:

Grupo 1: (OD₅₇₀ > 0,2), 22 amostras;

Grupo 2: ($0,1 \leq \text{OD}_{570} \leq 0,2$), 39 amostras;

Grupo 3: (OD₅₇₀ < 0,1), 36 amostras;

Foram consideradas como positivas as amostras com valores de absorvância do grupo 1 e 2, segundo recomendações de Wakimoto *et al.* (2004).

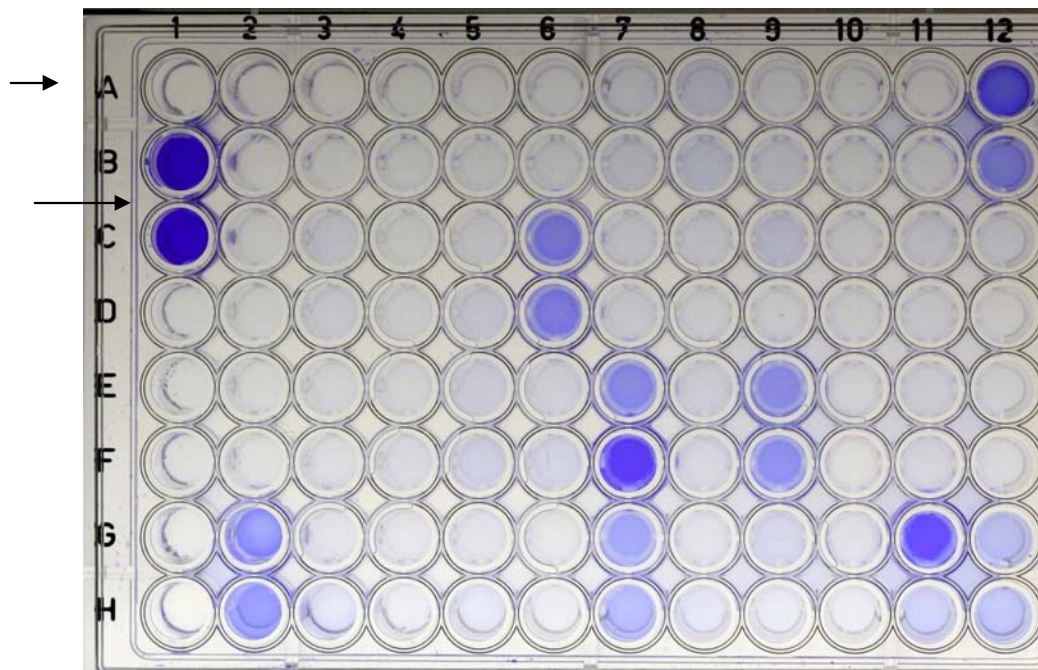


Figura 4. Formação de biofilme por amostras de *E. coli* isoladas de água. A coloração azul indica formação densa de biofilme. A seta maior indica o controle positivo e a seta menor aponta para o controle negativo.

4.1.6. Pesquisa da produção de película

A formação de uma película no meio de crescimento foi verificada em 60 amostras (61,8%). Destas, 32 apresentaram perfil de adesão agregativo nos ensaios de aderência em culturas de células HEp-2. As outras 28 amostras de *E. coli* variaram no padrão de adesão, mostrando adesão difusa e não característica ou foram não aderentes.

4.1.7. Teste de Citotoxicidade

Um total de 89 (91,7%) amostras de *E. coli* provocou alterações morfológicas em células Vero, HeLa e CHO. A adição de mitomicina C e polimixina B nos cultivos bacterianos não interferiram nos resultados. Morfologicamente, três tipos de alterações celulares foram visualizadas e as amostras foram agrupadas em três grupos, de acordo com o efeito citopático visualizado:

Grupo 1: Efeito de LTI: 9 (10,1%) amostras;

Grupo 2: Formação de agrupamentos celulares com desarranjo do citoesqueleto das células: 39 (43,8%) amostras;

Grupo 3: Arredondamento celular: 41 (46,1%) amostras.

Estes dois últimos efeitos citopáticos foram observados após 48h de incubação e o efeito de LT após 24 horas. Em um grupo de sete (7,2%) amostras não foram observadas alterações morfológicas das células em teste. Vacuolização do citoplasma das células foi observada em 31,7% (13) amostras que apresentaram alteração do tipo 3 e em 7,7% (3) das amostras que apresentaram alteração do tipo 2. Estas alterações foram visualizadas quando as amostras eram cultivadas em LB. Estes efeitos citopáticos são mostrados na Figura 5.

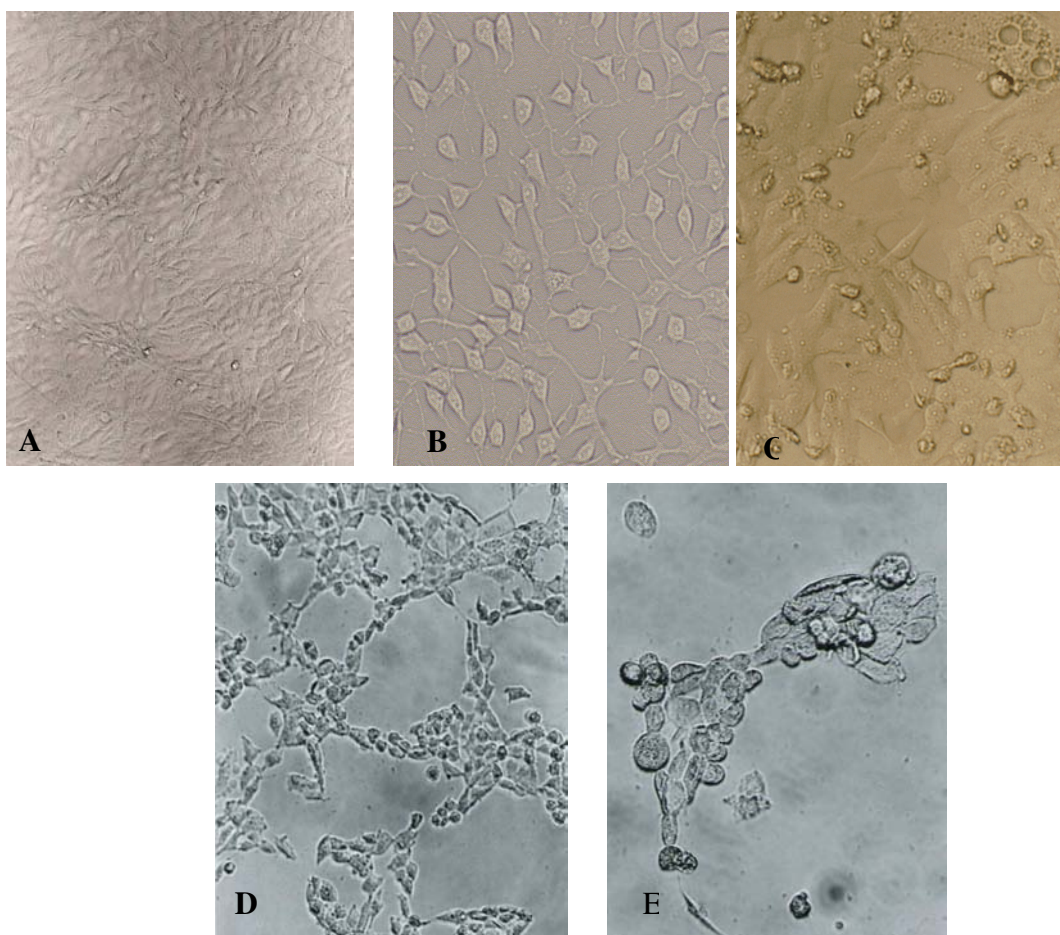


Figura 5. Alterações morfológicas provocadas por sobrenadantes de culturas de amostras de *E. coli* em células Vero. A – monocamada confluyente de células Vero (controle negativo); B– efeito citopático da toxina LT-I; C – arredondamento celular (Grupo 3); D – retração citoplasmática e desarranjo do citoesqueleto celular com conseqüente formação de “clusters” celulares após 48h (Grupo 2); E – um agrupamento de células em detalhe do grupo 2, após 48 h; F-. Aumentos 200x (A), 400x (B, C, D) 1000x (E).

4.1.8. Ensaio da termoestabilidade da atividade citotóxica

O teste de termoestabilidade foi realizado com o sobrenadante de cultura das 39 amostras de *E. coli* que provocaram formação de agrupamentos celulares com desarranjo do citoesqueleto (Grupo 2). Todos foram resistentes ao aquecimento por 65° C e 100° C durante 30 minutos.

4.1.9. Teste do Camundongo recém-nascido

Os sobrenadantes das 39 amostras de *E. coli* pertencentes ao grupo 2 foram pesquisados quanto à atividade enterotóxica em camundongos recém-nascidos. Os sobrenadantes de todas as amostras, tratados e não tratados termicamente, apresentaram atividade enterotóxica positiva a partir do cálculo realizado, mostrando valores superiores a 0,08 (dados não apresentados).

4.2 Estudo Genotípico: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Nenhuma amostra foi positiva para a presença dos genes *stx1*, *stx2*, *lt2*, *cnf1*, *cnf2*, *cdt*, *ethly*, *pet*, *inv*, *bfp*, *EAF*, *aagA*, *aafA*, *K88*, *987p*, *papGII* e *papGIII*. Os resultados de todos os fatores de virulência positivos nas amostras encontram-se relatados na Tabela 3.

Tabela 3 – Número e porcentagem de amostras de *Escherichia coli* isoladas de água positivas por PCR para fatores de virulência pesquisados.

Fator de virulência	Amostras positivas (%)
LT1	9 (9,3)
STa	1 (1,03)
STb	14 (14,4)
α HLy	6 (6,1)
Sat	3 (3,1)
East1	3 (3,1)
Pic	2 (2,06)
Kps	10 (10,3)
IucD	11 (11,3)
FimH	88 (88,7)
eae	6 (6,2)
PapC	3,1 (3)
PapG1	1 (1,02)

Tabela 4. Correlação entre as amostras de *E. coli* positivas para marcadores de virulência pesquisados pela PCR com perfil de adesão em células HEP-2.

Amostra	Aderência em HEP-2	Marcadores de virulência
2	Aacs	<i>stII</i>
3	NC	<i>stII, fimH</i>
5	NC	<i>ltl, fimH</i>
6	NA	<i>ahLy, fimH</i>
7	NC	<i>stII, ltl, fimH</i>
8	NC	<i>ltl, fimH</i>
9	NC	<i>ltl, fimH</i>
10	NA	<i>ahLy, fimH</i>
12	NA	<i>ahLy, fimH</i>
13	NA	<i>ahLy, fimH</i>
15	AD1	<i>sat, iucD, kps, papC, , fimH</i>
16	AAcs	<i>stII, papGI, papC fimH</i>
17	NA	<i>papC, fimH</i>
19	NA	<i>astA, ltl, fimH</i>
21	AAcs	<i>ltl, fimH</i>
25	AA	<i>stII, fimH</i>
26	AAcs	<i>stII, ltl, fimH</i>
30	NC	<i>stII, fimH</i>
32	AD1	<i>iucD, fimH</i>
33	AA	<i>stII, fimH</i>
35	NA	<i>stII, fimH</i>
36	NA	<i>kps</i>
38	NC	<i>kps, fimH</i>
39	NA	<i>eae, iucD, fimH</i>
44	NC	<i>iucD, fimH</i>
45	AAcs	<i>stII, fimH</i>
51	AD2	<i>sat, iucD, kps, ahLy, fimH</i>
53	AAcs	<i>ahLy, fimH</i>
54	NC	<i>stII, fimH</i>
59	NC	<i>ltl, fimH</i>
60	AAcs	<i>stI, fimH</i>
64	LAL	<i>eae, iucD, fimH</i>
65	AAcs	<i>stII, fimH</i>
66	AD1	<i>stII, fimH</i>
68	NC	<i>kps, fimH</i>
69	AAcs	<i>kps, fimH</i>
71	AD2	<i>stII</i>
72	AA	<i>eae, fimH</i>
74	NA	<i>astA, fimH</i>
78	AA	<i>pic, kps, fimH</i>
80	LAL	<i>eae, fimH</i>
82	AA	<i>eae, fimH</i>
83	AD1	<i>Sat, iucD, kps, fimH</i>
84	AA	<i>iucD, fimH</i>
92	AA	<i>astA, fimH</i>
94	AD2	<i>kps, fimH</i>
95	AA	<i>kps, fimH</i>
96	AA	<i>fimH, pic</i>

4.3 Associação dos fatores de virulência de amostras de *E. coli* com as amostras produtoras da citotoxina

Dentre as 39 amostras de *E. coli* produtoras de citotoxina (Grupo 2), quatro (10,3%) foram positivas para a enterotoxina STb; 7,7 % para o gene responsável pela montagem do grupo capsular K1-K5; 10,3 % para aerobactina; 5,1% para a toxina Sat e para α -Hly e 82% foram positivas para a fímbria tipo 1, como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Associação dos fatores de virulência positivos pela PCR e do padrão de adesão em células HEP-2 com as amostras de *E. coli* produtoras da citotoxina.

Amostras	STb	Sat	α -Hly	iucD	Kps	fimH	Padrão de Adesão
20						+	AA
24						+	AA
25	+					+	AA
34						-	NA
36					+	+	AAcs
40						-	AAcs
41						-	NA
43						+	AA
44				+		+	NC
45	+					+	AAcs
50						+	NA
51		+	+	+	+	-	AD1
52						+	AAcs
53			+			+	AAcs
57						+	NC
58						+	AD1
61						+	AAcs
62						+	AD1
63						-	AA
66	+					+	AD1
68				+		+	AA
70						+	AA
71	+					-	AD2
73						+	AAcs
76						+	AD2
77						+	AA
78					+	+	AA
79						+	AD2
83		+				+	AD1
84				+		+	AA
85						+	NC
86						+	AD2
87						-	AAcs
88						+	AD2
89						+	AA
91						+	AA
93						+	AA
94						+	AD2
96						+	AA

Tabela 6 – Número de amostras de *E.coli* classificadas, segundo padrões de adesão e marcadores de virulência, dentro dos grupos diarreiogênico e extraintestinal de *E. coli*.

Grupo Diarreiogênico	padrão de adesão	Genes de virulência	Nº de amostras
ETEC	AD, AA e NC	<i>eltIA, stI, stII</i>	24
EPEC	LAL, AA e NC	<i>eae</i>	6
EAEC	AA	<i>astA, pic</i>	36
DAEC	AD	<i>sat</i>	13
EXPEC	AD	<i>sat, iucD, kps, ahly, papC</i>	3
ND	-	-	15
Total	-	-	97

^a *Escherichia coli* presente na flora normal com potencial de causar infecção extraintestinal.

^b amostras não classificadas (não definidas) em nenhum grupo de *E. coli*.

5. DISCUSSÃO

A bactéria *Escherichia coli* tem sido bastante estudada em diversas áreas, porém, o estudo dessa bactéria oriunda de fontes ambientais ainda é escasso, apesar de ser usada como indicadora de contaminação fecal, os fatores de virulência em amostras isoladas de ambiente, principalmente de águas de abastecimento e consumo, são pouco relatados na literatura.

Em todo o mundo mais de 1,7 milhões de pessoas morrem por ano em virtude da ingestão de água de má qualidade, principalmente vítimas de doenças gastrointestinais (Ashbolt, 2004). Nove em cada dez mortes são de crianças que vivem em regiões em desenvolvimento (Benício & Monteiro, 2000). Devido a grande importância da *E. coli* na diarreia infantil, seus mecanismos de patogenicidade são intensamente pesquisados e compreendidos. Torna-se, portanto, relevante aplicar esse conhecimento às amostras de *E. coli* isoladas de água, confirmando seu potencial patogênico para homens e animais.

A produção de hemolisinas pelas bactérias pode ser um importante fator de virulência, por causar danos em tecidos e permitir a sua penetração em camadas de tecidos e subsequente invasão do hospedeiro (Beutin, 1991). Os resultados obtidos pelo teste de hemolisina em meio sólido evidenciaram que 50 amostras de *E. coli* foram produtoras de halo de hemólise em ágar sangue de cavalo. Este número pode ser considerado relativamente alto quando comparado a outros estudos feitos com amostras de *E. coli* isoladas de água. Mühlendorfe *et al.* (1996), por exemplo, encontraram apenas 2,1% de amostras hemolíticas em um total de 95 isolados. Além disso, foi observado, no presente trabalho, variação do número de amostras hemolíticas em relação às hemácias testadas, sendo as de cavalo e carneiro as mais susceptíveis às hemolisinas produzidas. Segundo Rennie & Arbuthnott (1974), as hemolisinas podem variar quanto a sua ação em diferentes eritrócitos.

O estudo molecular detectou apenas 6,2% de *E. coli* portadoras do gene para produção de α -hemolisina (α -Hly), demonstrando, portanto, que a maioria das amostras de *E. coli*, possivelmente, produzem uma hemolisina diferente da α -hemolisina.

A α -hemolisina e β -hemolisina produzidas por *E. coli* são semelhantes tanto no padrão de hemólise total em placas de ágar sangue, quanto na produção durante a fase exponencial de crescimento (Beutin, 1991). Isso nos leva a supor que as amostras, nas quais não detectamos o gene α -hly, possam ser produtoras de β -Hly.

Em *E. coli* que infecta humanos a produção da α -Hly está frequentemente associada a infecções extraintestinais (Cavalieri *et al.*, 1984; Ørskov & Ørskov, 1985; Korhonen *et al.*, 1985). Nestas cepas, comumente ocorre associação de α -hly com a fímbria P (codificada pelo gene *papC*) e com antígenos capsulares (Czirók *et al.*, 1986). Os determinantes genéticos da α -hly e fímbria P estão ligados ao cromossomo das cepas uropatogênicas O4 e O6 e ambos podem se comportar como elementos genéticos móveis (Hacker *et al.*, 1990; Low *et al.*, 1984). Em *E. coli* uropatogênica foi demonstrado que o operon *hly* está associado ao gene da toxina CNF1, em uma mesma ilha de patogenicidade (PAI) (Blum *et al.*, 1995). Os nossos resultados não mostraram associação do gene α -hly com CNF1 e na pesquisa genética realizada para fímbria P, foram encontradas apenas três amostras positivas para o gene *papC*, dentre as quais, duas não foram funcionais, pois não apresentaram nenhum dos alelos *papG*, responsável pela adesão bacteriana em seus receptores glicanos (Kuehn *et al.*, 1994). Uma amostra foi portadora do alelo *papG1*, normalmente encontrado em isolados de fezes (Féria *et al.*, 2001). Em meio as três amostras fímbria P positivas, apenas uma apresentou associação com α -Hly. A baixa frequência destes genes era esperada visto que esta fímbria tem sido correlacionada com amostras de *E.coli* associadas a pielonefrite (Sussman, 1997).

O papel da α -hemolisina nas infecções entéricas ainda não está claro. Nas fezes de indivíduos saudáveis, esta hemolisina foi encontrada em frequência de 6 a 22% (Beutin, 1991; Cavalieri *et al.*, 1984). Em cepas ETEC que infectam animais, a produção de α -hemolisina foi detectada (Prada *et al.*, 1991). Essas cepas podem carregar diferentes tipos de plasmídios que codificam, separadamente, genes para α -hemolisina, enterotoxinas e K88 (Prada *et al.*, 1991). Achados similares foram reportados em VTEC de suínos (Beutin, 1991). Segundo Beutin (1991), esta hemolisina não possui atividade enterotóxica e a perda do gene *hly* não afeta a capacidade diarreiogênica de ETEC de suínos. Contudo, a produção da α -hemolisina claramente é uma vantagem seletiva quando comparada com cepas não hemolíticas durante a colonização de intestino de suínos (Hampson *et al.*, 1988).

Além da α -hemolisina, uma outra hemolisina descrita por Beutin *et al.*, (1988) e denominada enterohemolisina foi investigada neste estudo. A enterohemolisina é geneticamente relacionada a α -hly e é produzida por cepas STEC. No entanto, ela difere das α e β hemolisinas por ser produzida durante a fase estacionária de crescimento, sendo detectada apenas em placas de ágar-sangue que contenham eritrócitos lavados com tampão PBS, 24h após a incubação (Beutin, *et al.*, 1988). Tanto nos estudos fenotípicos, empregando

placas de ágar-sangue elaboradas com hemácias lavadas, quanto no estudo genotípico, não foi detectada a produção desta hemolisina pelas *E. coli* em estudo.

A síntese de aerobactina, que também é freqüente em *E. coli* extraintestinal, não está relacionada com a produção de α -hemolisina (Ørskov *et al.*, 1988). Isto sugere que α -hly funciona como um mecanismo alternativo para aquisição de ferro na ausência de genes para aerobactina (Opal, *et al.*, 1990). Na pesquisa do gene *iucD*, que codifica uma enzima essencial na biossíntese da aerobactina, 11,3% (11) das amostras foram positivas. A aerobactina é considerada um componente importante na virulência de *E. coli*, relacionada com infecções extraintestinais em humanos e animais, pela habilidade de captar ferro da transferrina. Cepas isoladas de fezes também produzem aerobactina em alta proporção, mas a importância deste sideróforo na virulência de *E.coli* diarreio gênica permanece controversa (Martinez, *et al.*, 1990). Em estudo realizado na Alemanha, 41% de um total de 95 amostras isoladas de água apresentaram fatores de virulência descritos para *E. coli* extraintestinal, como aerobactina, e nenhum fator específico para *E.coli* diarreio gênica (Mühldorfe *et al.* 1996). Estes autores atribuíram a alta incidência de genes para aerobactina em isolados de água a uma possível eficácia desta em sequestrar íon Ferro em ambientes fora do hospedeiro

Em relação ao gene *kps* (K1 e K5), 10 amostras de *E. coli* em estudo foram positivas. *E. coli* que expressam K1 e K5 são capazes de colonizar o intestino, mas sua infecção é relacionada à septicemia e meningite em neonatais (Martindale *et al.*, 2000). Em meio aos nossos isolados, encontramos quatro amostras que apresentam simultaneamente vários genes (Tabela 4) que codificam fatores de virulência para *E. coli* extraintestinal. A presença destes genes talvez represente *E.coli* com potencial patogênico extraintestinal presente na flora normal.

Aderência em células tem sido proposta como uma importante característica de *E. coli* diarreio gênica (Scaletsky *et al.*, 1999a). Nos ensaios de adesão observou-se maior prevalência do padrão de adesão agregativo (AA), em que 49 amostras de *E. coli* (50,5%) aderiram neste padrão. Cepas EAEC aderem na superfície de células epiteliais e em substrato de vidro com um distinto padrão de tijolos empilhados (Nataro *et al.*, 1987). Neste trabalho foi observada uma variação do padrão de adesão agregativo. Essa variação consistiu na predominância da adesão agregativa nas lâminas (AAs), encontrado em 18 das 49 amostras agregativas. Esta mesma variação da adesão agregativa e outra em que foi observada ocorrer somente na célula (AAcel), também foram observadas por Nereida *et al.*, 2000. Variações do padrão de adesão agregativo também foram relatadas em outro trabalho (Suzart *et al.*, 2001).

Resultado semelhante ao nosso foi relatado em São Paulo, por Gomes *et al.* (1998), onde foi detectado 61,7% das amostras com AA e 31,8% com AAcS de um total de 415 isolados. De maneira similar aos nossos resultados, estes autores também não encontraram o padrão AAcel. Segundo Wakimoto *et al.*, (2004), a heterogeneidade no padrão de aderência pode ser devido às variações nas fímbrias do grupo EAEC.

O padrão de adesão difuso foi encontrado em 16,5% das amostras analisadas. Yamamoto *et al.*, (1997) sugeriram uma divisão para cepas DAEC em dois subgrupos: DAEC tipo 1 e DAEC tipo 2. Segundo estes autores, DAEC tipo 1 exibe aderência somente nas células, não aderindo em plástico ou vidro e está relacionada com a fímbria F1845, enquanto o tipo DAEC 2 exibe aderência tanto em células como em lâminas, e carregam uma proteína externa de membrana de 57 kDa como uma adesina. Em nossos estudos encontramos 5 amostras de *E. coli* com adesão difusa somente nas células (DAEC 1) e 11 amostras que foram capazes de aderir nas células e na lâmina (DAEC 2).

Recentemente, foi demonstrada a expressão da toxina Sat (“secreted autotransporter toxin”) em cepas DAEC isoladas de fezes (Taddei *et al.*, 2003). Dentre as nossas amostras DAEC, três (18,75%) apresentam o gene para Sat. Apesar da toxina Sat ser frequentemente relacionada com *E. coli* uropatogênica (Guyer *et al.*, 2000), sua importância na diarreia vem sendo demonstrada. A atividade enterotóxica da Sat foi demonstrada pelo acúmulo de líquido em alça de coelho e em ensaios de Ussing Chambers (Taddei *et al.*, 2005), usando a cepa FBC 114, uma cepa DAEC isolada de criança com diarreia.

O perfil de adesão localizada (AL) não foi visto em nenhum dos nossos isolados, estando de acordo com nossos achados quanto à pesquisa do gene *bfp*, para o qual nenhuma amostra foi positiva. A fímbria BFP tem sido relacionada com a adesão localizada (Girón, *et al.*, 1991a). A adesão “localizada Like”, comumente associadas a cepas *eae* positivas, *bfp* e EAF negativas, foi encontrada em apenas duas amostras de *E. coli*. Porém, quatro amostras, também portadoras do gene *eae*, apresentaram outros padrões de aderência, sendo que três aderiram de maneira não característica e uma mostrou-se agregativamente aderida. Segundo Trabulsi *et al.* (2002), EPEC atípicas podem apresentar o padrão de adesão “localizada Like” (LAL), podendo também apresentar AD eAA. Segundo Rosa *et al.* (2001), *E. coli* que possuem este perfil (*eae*+/- EAF-/ *stx*-) têm sido correlacionadas com diarreia aguda.

Cepas EAEC têm demonstrado capacidade de aglutinar eritrócitos de uma variedade de espécies animais e para certos sorotipos esta aglutinação é manose-sensível (Qadri *et al.*, 1994). Também foi reportado que EAEC formam uma película quando crescidas em LB, uma

característica proposta como um simples e rápido teste para identificação destas bactérias (Albert *et al.*, 1993). Além disso, a formação de biofilme por este grupo foi recentemente relatada tanto na mucosa intestinal como em substratos “in vitro” (Sheikh *et al.*, 2001). Em virtude do alto número de amostras aderindo de forma agregativa às células HEp-2, estas três características fenotípicas de EAEC foram estudadas e foi verificada produção de película em 32 amostras de *E. coli* (65,3%). No entanto, consideramos que este não é um teste seguro para identificação de EAEC, pois, 28 amostras que não apresentaram perfil agregativo também produziram a película na superfície do meio de cultura.

No que diz respeito à hemaglutinação, 11 das 12 amostras agregativas mostraram perfil MHSA. Este teste também não foi considerado seguro na identificação de amostras EAEC, pois, além da baixa frequência de amostras hemaglutinantes, outras fímbrias, ou seja, aquelas possivelmente responsáveis pelo perfil agregativo, podem exibir este tipo de hemaglutinação. Um exemplo clássico é a fímbria tipo 1, presente na maioria das *Enterobacteriaceae*, e que neste trabalho, foi positiva para todas as amostras capazes de aglutinar eritrócitos.

Moreira *et al.* (2003), propuseram um papel da fímbria tipo 1 na adesão agregativa e, de fato, 45 (91,8%) das nossas amostras EAEC apresentaram fímbria tipo 1, mas este perfil só foi inibido na presença de manose em 4 amostras (8,2%). Isto indica que, provavelmente esta fímbria não está envolvida na adesão agregativa das *E. coli* em estudo. Ao todo, a fímbria tipo 1 foi encontrada em 70 (72,2%) dos nossos isolados pelo teste de hemaglutinação manose-sensível (MSHA). Porém, pela PCR 88 (90,7%) das nossas amostras são portadoras do gene *fimH*, o que significa que 20,5% (18) não expressaram a fímbria tipo 1 durante a realização dos testes de hemaglutinação. Nossos resultados vão de acordo com o descrito na literatura em que cerca de 70 a 80% dos tipos selvagens de *E. coli* apresentam esta fímbria. O papel da fímbria tipo 1 na infecção intestinal ainda não é claro, mas diversos estudos têm demonstrando que sua presença aumenta a patogenicidade e persistência das infecções no trato urinário (Gunther *et al.*, 2001). Em adição, as fímbrias AAF/I e AAF/II de EAEC também foram investigadas quanto à presença de seus codificadores, mas não foram detectadas em nenhuma das nossas amostras. Portanto, não foi possível definir qual estrutura de adesão estaria envolvida na adesão agregativa por nós observada.

A terceira característica fenotípica de EAEC investigada, formação “in vitro” de biofilme, foi detectada em 45 (91,8%) das amostras. No estudo realizado por Sheikh e colaboradores (2001), 87% de amostras EAEC formaram biofilme em um ensaio “in vitro”,

semelhante ao nosso. Estes autores sugeriram que a expressão das fímbrias AAF é requerida para a formação do biofilme, pois mutantes deficientes nestas fímbrias foram incapazes de produzir tal estrutura. Porém, semelhantemente aos nossos resultados, estes autores reportaram que algumas EAEC, que não possuem tais fímbrias, também formaram biofilme.

A fímbria tipo 1 também foi relatada como um instrumento para a formação de biofilme em *E. coli* K12. Foi demonstrado que esta fímbria era crítica para interação inicial de *E. coli* com superfícies abióticas (Pratt & Kolter, 1998). Levando-se em consideração que não detectamos amostras AAF positivas e que apenas 3 amostras formadoras de biofilme não apresentaram o gene *fimH*, poderíamos relacionar esta fímbria com o biofilme produzido em nossos ensaios. No entanto, diversas estruturas precisam ser pesquisadas para podermos inferir a este respeito. Dentre elas, está o antígeno 43 (Ag 43), uma proteína de superfície que confere agregação célula-célula e que pode ser visualizado macroscopicamente pela floculação das células bacterianas em meio líquido (Schembri *et al.*, 2004). Schembri *et al.* (2003), propuseram que este antígeno tenha um importante papel no desenvolvimento dos biofilmes bacterianos. Todavia, Sheikh *et al.*, (2001) eliminaram a possibilidade da participação do Ag 43 na formação dos biofilmes de EAEC. Por último, esta característica de *E. coli* deve ser vista com atenção no que tange a sua patogenicidade, pois biofilmes contribuem para a persistência da bactéria no meio ambiente, principalmente no ambiente aquático, onde os microrganismos estão sujeitos ao fluxo hidrodinâmico (Schembri & Klemm, 2001) e no cólon, caracterizando as diarreias persistentes, como as causadas por EAEC (Skeikh *et al.*, 2001).

Outra estrutura que pode estar envolvida na formação dos biofilmes é a cápsula, uma estrutura polissacarídica associada à superfície celular. Em *E. coli* mais de 80 tipos de polissacarídeos (denominados antígenos K) e mais de 170 polímeros diferentes derivados dos antígenos O podem compor a estrutura da cápsula (Whitfield & Roberts, 1999). Realizamos coloração utilizando tinta nanquin, em que se verifica o contraste da cápsula, com nossas amostras e verificamos que 75 (77,3%) apresentavam estrutura capsular (experimentos e resultados não mostrados). Destas, 48 (64%) apresentaram formação de biofilme, sendo mais uma estrutura que poderia estar mediando esta propriedade em nossos isolados. O grande número de amostras encapsuladas observado pode ser devido à proteção que ela provê contra o ataque de fagos no ambiente aquático. A cápsula exerce, também, proteção contra o dessecação em ambientes inóspitos, além de exibir propriedade antifagocitária em

infecções extraintestinais, sendo considerada um importante fator de virulência (Schembri *et al.*, 2004).

Toxinas são um dos principais fatores de virulência encontrados em praticamente toda *E. coli* patogênica, e algumas toxinas mostram forte associação com o tipo patogênico específico (Kuhnert *et al.*, 2000). Essas toxinas são codificadas por genes contidos em cromossomos, plasmídios, bacteriófagos e/ou transposons e nenhum determinante genético para tais toxinas é encontrado no genoma da *E. coli* K-12 (Mühldorfer & Hacker, 1994).

Investigamos a produção de citotoxinas através de ensaios em cultura de células Vero, HeLa e CHO. Nestes ensaios, verificamos que 91,7% (89) dos sobrenadantes de cultura das amostras provocaram alterações nas linhagens celulares testadas. Morfologicamente três tipos de alterações celulares foram visualizados: 1) Efeito citopático característico da enterotoxina termo-lábil de ETEC, observado em 9 (10,1%) dos sobrenadantes de cultura; 2) formação de agrupamentos celulares com desarranjo do citoesqueleto das células, verificado em 39 (43,8%) amostras e 3) arredondamento celular, observado em 41 (46,1%) amostras. Estes dois últimos efeitos citopáticos foram observados após 48h de incubação.

Realizamos uma triagem de genes para toxinas conhecidas de *E. coli* que pudessem estar provocando estes efeitos citopáticos. Porém, encontramos a presença de genes para produção de toxinas em apenas 37 (41,6%) dentre as 89 amostras: nove (11,1%) possuem genes para a toxina termolábil LTI produzida por ETEC; seis (6,7%) possuem genes para α -hemolisina; 14 (15,7%) foram positivas para STb; duas (2,2%) apresentaram o gene para Pic; três (3,4%) possuem o gene que codifica a toxina Sat e EAST1. No entanto, entre as 39 produtoras da toxina que causa desarranjo do citoesqueleto celular, apenas quatro (10,3%) foram positivas para o gene STb e duas (5,1%) positivas para os genes que codificam as toxinas Sat e α -Hly.

As amostras que produzem a citotoxina que provoca formação de agrupamentos celulares com desarranjo do citoesqueleto das células foram selecionadas, devido a um melhor título de produção observado nos ensaios de citotoxicidade, e foram submetidas a outros testes, como termoestabilidade e teste de Dean, para uma caracterização parcial da atividade citotóxica.

Bactérias patogênicas utilizam várias estratégias para modular a organização da actina do citoesqueleto. Algumas proteínas bacterianas catalizam uma modificação covalente da actina (Barbiere *et al.* 2002), mas muitas toxinas bacterianas atuam como adenil ciclases, as quais são introduzidas diretamente dentro do citosol da célula eucariótica e elevam os níveis

de cAMP intracelular. Elevações do cAMP modulam numerosos processos celulares incluindo reorganização da actina (igualmente à toxina LT de ETEC) (Hart *et al.* 1998).

A exposição das enterotoxinas termo-estáveis de *E. coli* a temperaturas de 100° C por 30 minutos não inibe sua atividade biológica. Quando a citotoxina, das *E. coli* deste estudo, foi aquecida por 60° e 100°C por 30 minutos, também foi observada termoestabilidade.

No ensaio “in vivo” verificou-se que o sobrenadante de cultura tratado termicamente a 100°C por 30 min. causou acúmulo de líquido em intestino de camundongos recém-nascidos. Estes resultados indicam que a citotoxina de *E. coli* é enterotóxica.

Acreditamos que os efeitos citotóxicos e atividade enterotóxica observados não são causados pela toxina STb, pois não há relatos na literatura de que STb provoque as alterações citotóxicas visualizadas em linhagens celulares, nem qualquer outro tipo de alteração morfológica. Até pouco tempo, a única forma de testar a atividade desta toxina era através de ensaios “in vivo” de alças intestinais de animais, principalmente suínos ou de intestino de ratos na presença de protease (Whipp, 1990). Beausoleil *et al.* (2002) desenvolveram um modelo celular “in vitro” para o estudo da atividade biológica da toxina STb, usando um método que emprega absorção do corante azul de tripan pelas células tratadas com essa toxina.

De acordo com dados da literatura, existem três tipos reconhecidos de toxinas termo-estáveis produzidas por *E. coli*, STa, STb e EAST1 (Kaper *et al.*, 2004). Considerando as informações acima e acrescentando que, de maneira semelhante a STb, STa e EAST1 não ocasionam alterações em culturas de células “in vitro” e, além disso, os genes codificadores dessas duas últimas toxinas não foram encontrados entre as 39 amostras que produzem a toxina em questão, possivelmente as *E. coli* isoladas de água estão produzindo uma nova toxina. Contudo, a natureza desta toxina ainda não é conhecida.

Escherichia coli e outras bactérias patogênicas incluindo *Klebsiella pneumoniae* e *Yersinia enterocolitica* produzem seus efeitos diarreiogênicos pela elaboração de enterotoxinas de baixo peso molecular e termo-estáveis (STs). As toxinas STs constituem uma família de peptídeos de baixo peso molecular, produzidos por diversas bactérias patogênicas (Rao, 1985). Existem variações destas toxinas que diferem em suas seqüências de aminoácidos, mas todas contêm um centro rico em cisteínas que é essencial para atividade biológica completa (Aimoto *et al.*, 1983; Gariepy *et al.*, 1987). Estes resíduos de cisteína se arranjam em pontes dissulfeto requeridas para a manutenção da conformição estrutural e funcional destas toxinas (Fasano, 1998). Em adição, a possibilidade de esta toxina ter

atividade enzimática foi verificada nas 39 amostras, produtoras da citotoxina em questão, através de ensaios específicos incluindo caseinase, lipase, lecitinase e gelatinase e nenhum resultado positivo foi encontrado (dados não apresentados).

Além desta possível enterotoxina, foi detectada presença da toxina LT-I, EAST1, Sat, Pic e α -hemolisina dentre as 97 amostras deste estudo, demonstrando o potencial patogênico destes isolados (Tabela 3). Um número relativamente alto de amostras pertencentes à categoria ETEC foi encontrado no nosso trabalho. Constituindo um total de 24 amostras (14 STb⁺, 1 STa⁺ e 9 LT-I⁺), sendo que duas apresentaram simultaneamente STb e LT-I. A presença de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) em água de consumo é um fato preocupante, visto que ETEC é uma importante causa de diarreia em crianças de países em desenvolvimento (Guth, 2000). A água pode ser um importante veículo de transmissão de ETEC, como já foi documentado em 1975 em uma grande epidemia por ETEC no lago Creater no Oregon. Sato *et al.* (1983) relataram a presença de 1,9% de ETEC de um total de 365 amostras de *E.coli* isoladas de água potável, no estado de São Paulo.

Cepas de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) produzem adesinas ou fatores de colonização que permitem a adesão na mucosa intestinal do hospedeiro, com consequente resistência ao movimento peristáltico (Levine, 1987). As fímbrias reconhecem receptores específicos de diversas células, incluindo eritrócitos. A capacidade de aderir ou não a eritrócitos (hemaglutinação) pode ser utilizada para identificação e classificação de diferentes fímbrias (Gaastra & Graaf, 1982). As fímbrias encontradas em amostras ETEC são, principalmente, F4 (K88), encontrada em ETEC de origem suína, F5 (K99) que se encontra em isolados de bovinos e suínos, F6 (987P) encontrada em *E.coli* de suínos, F41 que também é vista em isolados de suínos e bovinos e os CFAS (Fatores de colonização), associados com ETEC isoladas de humanos (Guth, 2000). Geralmente, cada uma destas fímbrias estão correlacionados a um padrão específico de hemaglutinação manose-resistente (MRHA). Assim sendo, CFA/I apresentam MRHA com hemácias humanas do grupo A (Evans *et al.*, 1980), CFA/II hemaglutina hemácias bovinas e F41 hemácias eqüinas (Alvarez *et al.*, 1991). Nossas amostras ETEC foram submetidas a testes de hemaglutinação com hemácias humanas do grupo A para a detecção do fator de colonização I (CFA/I) e com hemácias bovinas para a detecção do fator de colonização II (CFA/II) e nenhuma delas apresentou o padrão MRHA. A frequência de CFA/I ou CFA/II em ETEC tem sido, consideravelmente, variada em diferentes estudos (Ahren *et al.*, 1986). Esta variação pode ser explicada, em parte, pela perda do plasmídio que codifica para estes fatores durante a estocagem e repiques das cepas no

laboratório. Hemaglutinação manose-sensível também foi observada no ensaio com hemácias equínas, indicando um resultado negativo para a fímbria F41. As fímbrias K88 e 987 P estão associadas a amostras ETEC isoladas de suínos (Gaastra & Graag, 1982). Os genes que codificam estas fímbrias foram pesquisados pela PCR, não sendo encontrados nas nossas amostras ETEC. Portanto, não foi possível concluir se as amostras ETEC presentes na água de Ouro Preto são provenientes de suínos ou humanos.

Valentini *et al.*, (1992) relataram ausência de fatores de virulência em isolados de *E. coli* de água, sugerindo a ocorrência da perda de genes de virulência devido a ausência da pressão seletiva em isolados desta origem. Segundo Mühlendorfer *et al.* (1996), dentro do hospedeiro, onde os fatores de patogenicidade são “vencidos” pelo sistema imune, as bactérias necessitam, constantemente, adquirir vantagens seletivas.

No que se refere a enteropatogenicidade das amostras de *E. coli* do presente estudo, podemos dizer que, 24 amostras (24,7%) são amostras pertencentes à categoria ETEC, pois produzem enterotoxinas LTI, STa e STb. Adesão difusa foi observada em 16 (16,5%) das *E. coli* em estudo e poderiam ser definidas como DAEC. No entanto, dentre estas, três produzem a toxina STb e por isso foram classificadas como ETEC. De acordo com Régua-Mangia e colaboradores (2004), a maioria dos isolados ETEC mostram padrão de aderência difusa em ensaios de 3 horas usando células HEP-2 ou Caco-2. Todavia, nossas amostras ETEC mostraram distintos padrões de adesão (12 AA, sete NC, três AD e duas NA). Assim, classificamos as amostras ETEC de acordo com a produção de toxinas e não de acordo com o padrão de aderência “in vitro”. Definimos 13 (13,4%) como representantes da classe DAEC.

De acordo com Trabulsi *et al.* (1996), as EPEC são divididas em típicas e atípicas. As EPEC atípicas aderem em células no padrão localizado, porém de maneira frouxa, e são portadoras do gene *eae*. Desta maneira, podemos classificar seis (6,2%) de nossas amostras como sendo EPEC atípicas. Ainda de acordo com o padrão de adesão, 49 (50,5%) aderiram de forma agregativa em nossos ensaios. Porém, destas, 12 produzem toxinas de ETEC e uma possui o gene *eae*, o que nos permite concluir que 36 (37,1%) amostras pertencem ao grupo EAEC. Nenhum dos nossos isolados foi classificado como STEC, pois não detectamos os genes *stx1* e *stx2*. Em acréscimo, de acordo com Rosa *et al.* (2001) cepas *eae*⁺, *stx1* e *stx2*⁻, EAF⁻, tem sido relacionadas a sorogrupos EPEC.

E. coli do grupo EIEC também não foram observadas em nossos isolados, pois não detectamos o plasmídeo inv (pInv) nos mesmos. A ausência deste plasmídeo não implica, necessariamente, na perda da capacidade invasiva destas cepas (Abe *et al.*, 2001). Assim o

teste biológico de Sereny poderia ser realizado para confirmação deste resultado. No entanto, a principal característica das amostras EIEC, o teste de lisina descarboxilase negativo (Levine *et al.*, 1987b), não foi observado nas nossas *E. coli*. Diversos autores observaram que *E. coli* que não possuem características bioquímicas de EIEC invadem diferentes linhagens celulares (Abe *et al.*, 2001; Rosa, *et al.*, 2001), o que dificulta a correlação com o tipo diarreiogênico. Como pode ser observado na Tabela 6, classificamos 79 (81,4%) das *E. coli* isoladas de água de consumo dentro das classes, ETEC, EPEC atípica, EAEC e DAEC e nenhuma dentro da categoria das EHEC e EIEC. Diferentemente destes resultados, Lanna (1993) e Pereira (2003) relataram presença de amostras EIEC isoladas da água de consumo da cidade de Ouro Preto.

Assim, estes resultados podem contribuir para alertar população e autoridades quanto à necessidade de uma água potável de qualidade, totalmente livre de patógenos de origem fecal.

6. CONCLUSÕES

1. Um total de 50 amostras de *E. coli* provocou lise de eritrócitos de cavalo em meio sólido;
2. Foi observada predominância do padrão de adesão agregativo;
3. O sobrenadante de cultura de 89 amostras provocaram efeitos citopáticos em culturas de células Vero, HeLa e CHO. Dentre estes sobrenadantes, nove (10,1%) provocaram modificação celular pela produção da enterotoxina LT; 39 (40,2%) formaram agrupamentos celulares com desarranjo do citoesqueleto das células e 41 (42,3%) provocaram arredondamento celular;
4. Os sobrenadantes de cultura que provocaram desarranjo do citoesqueleto foram resistentes ao aquecimento por 30 minutos a 100 °C e tiveram atividade enterotóxica em camundongos recém-nascidos;
5. Na pesquisa de genes codificadores de toxinas, foi encontrado positividade para os seguintes genes: *eltIA*, *stI*, *stII*, *astA*, α -*hLy*, *sat* e *pic*;
6. Foram detectadas quatro amostras de *E. coli* com potencial patogênico extraintestinal, carreando os genes α -*Hly*, *iucD*, *papC*, *papGI* e *kps MTIII*;
7. Não encontramos amostras portadoras dos genes que codificam: Stx1, Stx2, Stx2v, CDT, CNF1, CNF2, EnHly, PET, EAF, BFP, pINV, AAF/I, AAF/II, K88 e 987p.
8. Baseado na aderência em células, na produção de toxinas e na presença genes de virulência, 24 amostras foram classificadas como ETEC, seis como EPEC atípicas, 36 EAEC e 13 como DAEC. Nenhuma amostra foi classificada como EHEC e EIEC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, C.M., Knutton, S., Pedrosa, M.Z., Freymüller, E., Gomes, T.A.T. An enteroaggregative *Escherichia coli* strains of serotype O111:H12 damages and invades culture T84 cells and human colonic mucosa. **FEMS Microbiol. Lett.** 203: 199-205, 2001.
- Adam, T., Arpin, M., Prevost, M.C., Gounon, P. Sansonetti, P.J. Cytoeskeletal rearrangements and functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. **J. Cell. Biol.** 129: 367-381, 1995.
- Agard, L., Alexandre, C., Grenn, S., Jackson, M., Patel, S., Desiyun. A. microbial quality of water supply to an urban community in Trinidad. **J. Food. Prot.** 65: 1297-1303, 2002.
- Ahren, C.M *et al.* Comparison of Methods for Detection of Colonization Factor Antigens on Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** 23: 586-591, 1986.
- Aimoto, S., Watanabe, H., Ikemura, H., Shimonishi, Y., Takeda, T., Takeda, Y, Miwatani, T. Chemical synthesis of highly potent and heat-stable analog of an enterotoxin produced by a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 112: 320-326, 1983.
- Albert, M.J., Quadri, F., Haque, A., Bhuiyan, N.A. Bacterial clump formation at surface of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microb.** 31: 1397-1399, 1993.
- Alderete, J.F. & Robertson, D.C. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 19: 1011-1020, 1978.
- Alvarez, B., Alvarez, M.B., Garcia, E.A.G. Mecanismos de patogencis de los *Escherichia coli* enteropatogénicos, enterotoxigénicos, enteroinvasores y enterohemorrágicos. **Rev. Microbiol. Clin.** 163: 163-176, 1991.
- Análise da Água. Disponível em: <http://www.agrolab.com.br/analises2htm>. Acesso em 21 marc. 2005.
- Andrews, G.P., Hromockyi, A.E., Coker, C., Maurelli, A.T. Two novel virulence loci, *mxiA* e *mxiB*, in shigella flexneri 2a facilitate excretion of invasive plasmid antigens. **Infect. Immun.** 59: 1997-2005, 1991.
- Ashbolt, N. J. Microbiol contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology.** 198: 229-238, 2004.
- Badge, U.S. & Rangari, A. K. Periodicity of coliform bacteria in an aquatic environment. **Wat. Sci. Tech.** 40: 151-157, 1999.
- Barbiere, J. T., Riese, M. J., Aktories K. Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 18: 315-44, 2002.

- Bates, A. J. Water as consumed and its impact on the consumer – do we understand the variables? **Food Chem. Toxicol.** 38: S29-S36, 2000.
- Baudry, B., Aureli, A.T., Clerc, P., Sadoff, J.C., Sansonetti, P.J. Localization of plasmid loci necessary for the entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells, and characterization of one locus encoding four immunogenic polypeptides. **J. Gen. Microbiol.** 133: 3403-3413, 1987.
- Baudry, B., Savarino, S.J., Vail, P., Kaper, J.B., Levine, M.M. A sensitive and specific DNBNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.** 161: 1249-1251, 1990.
- Bauer, M.E. & Welch, R.A. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. **Infect. Immun.** 64: 167-175, 1996.
- Beausoleil, H.E., Labrie, V., Dubreuil, J. D. Trypan blue uptake by Chinese hamster ovary cultured epithelial cells: a cellular model to study *Escherichia coli* STb enterotoxin. **Toxicon.** 40: 185-191, 2002.
- Beebakhee, G., Louie, M., De Azevedo, J., Brunton. Cloning and nucleotide sequence of the *eae* gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:HH7. **FEMS Microbiol. Lett.** 91: 63-68, 1992.
- Beinke, C., Laarmann, S., Wachter, C., Karch, H., Greune, L., Schmidt, M.A. Diffusely adhering *Escherichia coli* strains induce attaching and effacing phenotypes and secrete homologs of Esp proteins. **Infect. Immun.** 66: 528-539, 1998.
- Benício, M.H.D. & Monteiro, C.A. Tendência secular da doença diarreica na cidade de São Paulo (1984-1996). **Rev. Saúde Pública.** 34: 83-90, 2000.
- Benz, I. & Schmidt, M.A. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strains 2787 (O126:H27). **Infect. Immun.** 60: 13-18, 1992.
- Bernet-Camard, M.F., Coconnier, S., Hudault, S. Servin, A.L. Differential expression of complement proteins and regulatory decay accelerating factor in relation to differentiation of cultured human colon adenocarcinoma cells lines. **Gut.** 38: 548-553, 1996.
- Bernier, C., Gounon, P., Bouguénec, C.L. Identification of an Aggregative adhesion Fimbria (AAF) type III-encoding Operon in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* as a sensitive probe for detection the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.** 70: 4302-4311, 2002.
- Bessen, D. & Gottschlich, E.C. Enhanced invasion by enteroinvasive *E. coli* of multinucleated HeLa cells. **FEMS Microbiol. Lett.** 44: 313-316, 1987.

- Besser, T.E., Hancock, D.D., Pritchett, L.C., Mcrae, E.M., Rice, D.H., Tarr, P.I. Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. **J. Infect. Dis.** 157: 726-729, 1997.
- Betley, M.J., Miller, V.L., Mikelanos, J.J Genetics of bacterial enterotoxinas. **Ann. Rev. Microbiol.** 40: 577-608, 1986.
- Beutin, L. The diferente hemolysins of *Escherichia coli*. **Med. Microbiol. Immunol.** 180: 167-182, 1991.
- Beutin, L.; Gleier, K.; Kontny, I.; Echeverria, P., Scheutz, F. Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* (EIEC) isolated in Germany. **Epidemiol. Infect.** 118 (3): 199-205, 1997.
- Beutin, L., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R., Ørskov, I., Ørskov, F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Zen. Bakteriolog. Hyg.** 267: 576-588, 1988.
- Bilge, S.S., Clusen, C., Law, W., Moseley, S.L. Molecular characterization of a fimbrial adhesion, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **J. Bacteriol.** 171: 4281-4289, 1989.
- Blanco, M. Blanco, J.E., Rodriguez, E., Abalia, I., Alonso, M.P., Blanco, J. Detection of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction (PCR): comparison with results obtained using phenotypic methods. **J. Microl. Met.** 31: 37-43, 1997a.
- Blanco, M., Blanco, J., Ramos, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **Amer. J. Vet. Res.** 54: 1446-1451, 1993.
- Blanco, M., *et al.*, Enterotoxigenic, Verotoxigenic and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **Amer. J. Vet. Res.** 54: 1446-1451, 1994.
- Blanco, M., *et al.*, Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: Relationship with toxic phenotypes. **J. Clin. Microbiol.** 35: 2958-2963, 1997b.
- Blum, G., falbo, V., Caprioli, A., Hacker, J. Gene cluster encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, prs-fimbriae and alpha hemolysin from the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. **FEMS Microbiol. Letters.** 126: 189-195, 1995.
- Bopp, C.A; Brenner, F. W.; Wells, J. G.; Strockbine, N.A. *Escherichia coli* and *Samlmonella*. p. 459-465. In Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. (ed) **Man. Clin. Microbiol.** ASM Press, Washington D.C, 1999.
- Brenner, D.J., Fanning, G.R., Miklos, G.V., Steigerwalt, A.G. Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 23: 1-7, 1973.

- Calderwood, S.B., Acheson, D.W.K., Keusch, G.T. *et al.* Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **Amer. Soc. Microbiol. News.** 62: 118-119, 1996.
- Caras, I.W., Weddel, G.N., Davitz, M.A., Nessenzweig, V., Martin, D.W.Jr. Signal of attaching of a phospholipids membrane anchor in decayaccelerating factor. **Science.** 238: 1280-1283, 1987.
- Cavalieri, S.J., Bohach, G.A., Snyder, I.S. *Escherichia coli* α -hemolysin: characteristics and probable role in pathogenecity. **Microbiol. Rev.** 48: 326-343, 1984.
- Center for Biofilm Engeneering. Biofilm Heterogeneity. **Center for Biofilm Engeneering News.** Montana State Univ. 2(1): 1-2, 1994.
- Chalmers, R.M., Aird, H., Bolton, F.J., Waterborne *Escherichia coli* O157:H7. **Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.** 88: 124S-132S, 2000.
- Chart, H., Smith, H.R., Rowe, B. Enteroaggregative strains of *Escherichia coli* belonging to serotypes O126:h27 and O44H18 express antigenically similar 18 kDa outer membrane-associated proteins. **FEMS Microbiol. Lett.** 132: 17-22, 1995.
- Cravioto, A., Tello, A., Navarro, A., Ruiz, J., Villafan, H., Urbe, F., Eslava, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. **Lancet** 337: 262-264 1991.
- Cruz W. B. Diagnóstico Hidrogeológico. In: Alvim, P. R. J. Desenvolvimento Ambiental de Ouro Preto – Microbacia do Ribeirão do Funil – MG. CETEC/IGA – SAE/PR, 1994.
- Czczulin, J.R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M.H., Navarro-Garcia, F., Nataro, J.P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 65 (10): 4135-4145, 1997.
- Czirók, M. H., Csiszár, K., Csik, M. Virulence factors of *Escherichia coli*. Correlation with *Escherichia coli* pathogenicity of haemolysin production, haemagglutination capacity, antigens K1, K5 and colicinogenicity. **Acta. Microbiol. Hung.** 33: 69-83, 1986.
- Daigle, F., Harel, J., Fairbrother, J.M. Expression and detection of pap, sfa, and encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. **Clin. J. Microbiol.** 40: 286-291, 1994.
- Day, N.P., Scotland, S.M., Rowe, B. Comparison of HEp-2 tissue culture test with the serény test for detection of enteroinvasive in *Shigella* ssp. and *E. coli* **J. Clin. Microbiol.** 13: 592-97, 1981.
- Debroy, C., Yealy, J., Wilson, R.A., Bhan, M.K., Kumar, R. Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect, Immun.** 63: 2873-2879, 1995.

- De Graaf, F.K. & Klassen, P. Nucleotide sequence of the gene encoding the 987P fimbrial subunit of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 42: 253-25, 1997.
- Donnenberg, M.S. & Kaper, J.B. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. **Infect. Immun.** 59: 4310-4317, 1991.
- Donnenberg, M.S. & Kaper J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 60: 3953-3961, 1992.
- Donta, S.T., Moon, H.W., Whipp, S.C. Detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. **Science.** 36: 851-856, 1974.
- Dupont, H.L., Formal, S.B., Hornick, R.B., Snyder, M.J., Libonati, J.P., Sheahan, D.G., Labrec, E.H., Kalas, J.P. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. **N. Engl. J. Med.** 285: 1-9, 1971.
- Echeverria, P., Serichantalerg, O., Changehawalit, S., Baudry, B., Levine, M.M., Oskov, F., Oskov, I. Tissue culture-adherent *Escherichia coli* in infantile diarrhea. **J. Infect. Dis.** 165, 141-143, 1992.
- Echeverria, P., Seriwatana, J., Tylor, D.N., Tyrapat, C., Rowe, B. *Escherichia coli* contains plasmids coding for heat-stable, other enterotoxins and antibiotic resistance. **Infect. Immun.** 48: 843-846, 1985.
- Edberg, S.C., Rice, E. W., Karlin, R.J., Allen, M.J. *Escherichia coli* :The best biological drinking water indicator for public health protection. **J.Applied Microbiology.** 88: 106S-116S, 2000.
- Elliot, S.J.& Kaper, J.B. Role of type 1 fimbriae in EPEC infections. **Microbiol. Pathog.** 23: 113-118, 1997.
- Elliot, S.J., Wainwright, L., Macdaniel, T.K., Kaper, J.B. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.** 28: 1-4, 1998.
- Eslava, C., Navarro-Garcia, F., Czczulin, J.R., Henderson, I.R., Cravioto, A., Nataro, J.P. Pet, na autotransporter enterotoxin from enteraggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 66(7): 3155-3163, 1998.
- Evans, D.G. & Evans, J.R. New surface associated heat-labile colonization factor antigen (CFA-II₊ produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. **infect. Immun.** 21: 638-647, 1978.
- Evans, D.G., Silveira, R.P., Evans, J.R., Chase, D.G., Gorbach, S.L. Plasmid controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for human. **Infect. Immun.** 12: 656-657, 1975.
- Evans, Jr., Evans, D. G., Yong, L. S., Pitt, J. Hemagglutination typing of *Escherichia coli*:

- definition of seen hemagglutination types. **J. Clin. Microbiol.** 12: 235-242, 1980.
- Fagundes-Neto, U. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in infantis: clinical aspects and small bowel morphological alterations. **Rev. Microbiol.** 27: 117-119, 1996.
- Fasano, A. Cellular microbiology: how enteric pathogens socialize with their intestinal hosts. **J. Pediatr. Gastroen. Nutr.** 26: 520-532, 1998.
- Feldman, K.A., Mohle-Boetani, J.C., Ward, J., Furst, K., Abbott, S.L., Ferero, D.V., Olsen, A., Werner, S.B. A cluster of *Escherichia coli* O157: Nonmotile infections associated with recreational exposure to lake water. **Public Health Rep.** 117: 380-385, 2002.
- Féria, C., Machado, J., Correia, J.D., Gonçalves, J., Gaastra, W. Distribution of *papG* alleles among urophatogenic *Escherichia coli* isolated from different specis. **FEMS Microbiol. Letters.** 202: 205-208, 2001.
- Finlay, B.B., Rsenshine, I., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. Cytoesqueletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. **Infect. Immun.** 60: 2541-2543, 1992.
- Formal, S.B., & Hornich, R.B. Invasive *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** 137: 641-644, 1978.
- Frankel, G., Candy, D.C.A., Everest, P., Dougan, G. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *hafnia alvei*. **J. Infect. Dis.** 164: 1835-1842, 1994.
- Franklin, M.A., Francis, D. H., Mathew, A.G. A PCR-based method of detection and dif of K88+ adhesive *Escherichia coli*. **J Vet Diagn Invest.** 8: 460-463, 1996.
- Fransolet, G., Villers, G., Masschelein, W.J. Influence of temperature on bacterial development in waters. **Ozone Sci.** 7: 205-227, 1985.
- Freedman, D.J., Tacket, C.O., Delehanty, A., Maneval, D.R., Nataro, J.P., Crabb, J.H. Milk immunoglobulin with specific activity against purified colonization factor antigens can protect against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** 177: 662-667, 1998.
- Fukuta, S., Magnani, E.M., Twiddy, R., Holmes, K., Ginsburg, V. Comparison on the carbohydrate-bining specificities of cholera toxin an *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin LTh-I, LTh-IIa and LTh-IIb. **Infect. Immun.** 56: 1748-1753, 1988.
- Gaastra, W. & Graag, F.S. Host specific fimbriae adhesion of non invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiol. Rev.** V. 46, p. 129-161, 1982.
- Garipey, J., Judd, A.K., Schoolnik, C.K. Importance of disulfide bridges in the structure and activity of *Escherichia coli* enterotoxin 1b. **Proc. Natl. Sci.** 84: 8907-8911, 1987.

- Gilligan, P.H. *Escherichia coli*: EAEC, EHEC, EIEC, ETEC. **Clin. Lab. Med.** 19: 505-521, 1999.
- Giron, J.A., Ho, A.S.Y., Schoolnik, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**. 254: 710-713, 1991a.
- Giron, J.A., Jones, T., Millán-Velasco, F., Castro-Muños, E., Zárate, L., Fry, J.G.F., Moseley, S.L., Baudry, B., Kaper, J.B., Schoolnik, G.K., Riley, L.W. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. **J. Infect. Is.** 163: 507-513, 1991b.
- Giron, J.A., Torres, A.G., Freer, E., Kaper, J.B. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. **Mol Microbiol.** 44: 361-379, 2002.
- Goldberg, M.B., Barzu, O., Parsot, C., Sansonetti, P.J. Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella flexneri* protein involved in intracellular movement. **J. Bacteriol.** 175: 2189-2196, 1993.
- Gomes, T.A., Rassi, V., Macdonald, K.L., Ramos, S.R., Trabulsi, L.R., Vieira, M.A., Guth, B.E., Candeias, J.A., Ivey, C., Toledo, M.R. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.** 164: 331-337, 1991.
- Gomes, T.A.T., Vierira, M.A.M., Abe, C.M., Rodrigues, D., Griffin, P.M., Ramos, S.R.T.S. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.** 36: 1998.
- Greenberg, D.E., Jiang, Z.D., Steffen, R. *et al.* Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. **J. Infect. Dis.** 185: 944-949, 2002.
- Griffin, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Blaser, M.J., Smith, P.D., Ravdin, J.I., Greenberg H.B., Guerrant, R.L. (ed). **Infections of the gastrointestinal tract**. New York: Raven Press, p. 739-761, 1995.
- Griffin, P.M. & Tauxe, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidem. Rev.** 13: 60-98, 1991.
- Gunther I. V., N.W., Lockatell. V., Johnson, D.E., Mobley, H.L.T. *In vivo* Dynamics of Type 1 fimbria regulation in uropathogenic *E. coli* during experimental urinary tract infection. **Infect. Immun.** 69 (5): 2838-2846, 2001.
- Gunzburg, S.T., Tornieporth, N.G., Riley, L.W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR – bases of the detection of the bundle – forming pilus gene. **J. Clin. Microbiol.** 33: 1375-1377, 1996.

- Guth, B.E.C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* – An Overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 95: 95-97, 2000.
- Guth, B.E.C., Twiddy, E.M., Trabulsi, L.R., Holmes, R.K. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxin of *E. coli*. **Infect. Immun.** 54: 529-536, 1986.
- Guyer, D.M., Henderson, I. R., Nataro, J. P., Mobley, H. L. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 38: 53-66, 2000.
- Gyles, C.L., So, M., Falkow, S. The enterotoxin plasmid of *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** 130: 40-49, 1974.
- Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R., Goebel, W. Detection of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins: occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. **Microb. Pathog.** 8: 213-225, 1990.
- Hampson, D.J., Fu, Z.F, Bettelheim, K.A., Wilson, N.W. Managerial influences on the selective proliferation of two strains of haemolytic *Escherichia coli* in weaned pigs. **Epidemiol. Infect.** 100: 213-220, 1988.
- Harris, J.R., Mariano, J., Wells, J.G., Payne, B.S., Donnel, H.D., Cohen, M.L. Person- to-person on transmission in outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. **Am. J. Epidemiol.** 122: 245-252, 1985.
- Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T, Roscoe, W., Singer, W. D. Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by G13. **Science.** 280, 2112–2114, 1998.
- Henderson, I.R. & Nataro, J.P. Virulence factors of autotransporter proteins. **Infect. Immun.** 69: 1231-1243, 2001.
- Henderson, I.R., Hicks, S., Navarro-Garcia, F., Elias, W.P., Phillips, A.D., Nataro, J.P. Involvement of enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage. **Infect. Immun.** 67: 5338-5344, 1999.
- Hicks, S., Candy, D.C.A., Phillips, A.D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. **Infect. Immun.** 6: 4751-4760, 1996.
- Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J.B., Dougan, G., Phillips, A.D. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue *in vitro*. **Infect. Immun.** 66: 1570-1578, 1998.
- Hinson, G. & Williams, P. H. Adhesins of pathogenic *Escherichia coli*. In: HOPWOOD, D.A.; CHARTER, K. **Genetics of bacterial Diversity**, cap. 14, p. 287-307, Academic Press limited, London, UK., 1989.

- Holmes, R.K., Twiddy, E.M., Pickett, C.L. Purification and characterization of type II heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 53: 464-473, 1986.
- Huang, D.B. & Dupont, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An emerging pathogen in children. **Pediat. Infect. Dis.** 15: 266-271, 2004.
- Jackson, M.P., Neill, R.J., O'brien, A.D. Nucleotide sequence analyses and comparison of the structural genes for shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiol. Lett.** 44: 109-114, 1987.
- Jallat, C., Darfeuille-Michaud, A., Rich, C., Joly, B. Survey of clinical isolates of diarrhoeagenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. **Res. Microbiol.** 145: 621-632, 1994.
- Jallat, C., Livrelli, V., Darfeuille-Michaud, A., Rich, A., Joly, B. *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. **J. Clin. Microbiol.** 31: 2031-2037, 1993.
- Jann, K. & Hoschutsky, H. Nature and organization adhesions. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 151: 55-85, 1991.
- Jarvis, K.G., Giron, J.A., Jerse, A.E., Mcdaniela, T.K., Sonnenberg, M.S., Kaper, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 92: 7996-8000, 1995.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., Kaper, J.B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 87: 7839-7843, 1990.
- Johnson, J.R. & Stell, A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with uropis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.** 181: 261-272, 2000.
- Karkkainen, U.M., Kauppinen, J., Ikaheimo, R., Katila, M. L., Siitonen, A. Rapid and specific detection of three different G adhesion classes of P-fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction, **J. Microbiol. Meth.** 34: 23-29, 1998.
- Kaper, J.B. & Jarvis, K.G. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via putative type III secretion system. **Infect. Immun.** 64: 4826-4829, 1996.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev.** 2: 123-140, 2004.
- Karmali, M.A, Steele, B.T., Petric, M., Lim, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **The Lancet.** I: 619-620, 1983.

- Karmali, M.A., Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol Rev.** 2: 5-38, 1989.
- Kennedy, D.J., Grenberg, R.N., Dunn, J.A., Alberthy, R., Ryerse, J.S., Guerrant, R.L. Effects of *Escherichia coli* enterotoxin STb on the intestine of mice, rats, rabbits and piglets. **Infect. Immun.** 46: 639-646, 1984.
- Kenny, B. & Finlay, B.B. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals in epithelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 92: 7991-7995, 1995.
- Kenny, B., De Vinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., Finlay, B.B. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell.** 91: 511-520, 1997.
- Knutton, S., Shaw, R.K., Bhan, M.K., Smith, H.R., McConnell, M.M., Cheasty, T., Williams, P.H., Baldwin, T.J. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. **Infect. Immun.** 60: 2083-2091, 1992.
- Knutton, S.I., Rosenshine, I., Pallen, M.J., Nisan, I., Neves, B.C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G., Frankel, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO. J.** 17: 2166-2176, 1998.
- Konowalchuk, J. Speirs, J. L., Stavrac, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 18: 775-779, 1977.
- Kuehn, M.J., Jacob-Dubuisson, F., Dodson, K., Slonim, L., Striker, R., Hultgren, S., J. Genetic, Biochemical and structural studies of biogenesis of adhesive pilli in bacteria. **Meth. Enzym.** 236: 282-306, 1994.
- Kuhnert, P., Boerlin, P., Frey, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolated from water, food and environment. **FEMS Microbiol. Rev.** 24:107-117, 2000.
- Lanna, M.C.S. Pesquisa de rotavírus e outros agentes associados as diarreias humanas no município de Ouro Preto, MG. Tese de Doutorado, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1993.
- Las Casas C. C. B. Introdução. In: Alvim P. R. J. Desenvolvimento Ambiental de Ouro Preto – Microbacia do Ribeirão do Funil – MG. CETEC/IGA – SAE/PR, 1994.
- Law, D. & Kelly, J. Use of Heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157: H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* serogroups. **Infect. Immun.** 63: 700-702, 1995.
- Lechevallier, M.W., Welch, N.J., Smith, D.B. Full-scale study of factors related to coliform regrowth in drinking water. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 2201-2211, 1996.
- Leclerc, J.E., Li B, Payne Wl Wl, Cebula, T.A. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and Salmonella pathogens. **Science.** 274: 1208-1211, 1996.

- Levine, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **J. Infect. Dis.** 155: 377-389, 1987.
- Levine, M.M., Ferreccio, C., Prado, V., Cayazzo, M., Abrego, P., Martinez, J., Maggi, L., Baldini M.M., Maneval, D., Kay, B., Guers, L., Lior, H., Wasserman, S.S., Nataro, J.P. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrhea infection in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. **Am. J. Epidemiol.** 138: 849-869, 1993.
- Levine, M.M., Xu, J., Kaper, J.B. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157: H7 and the other serotypes that cause hemorrhagic and hemolytic uremic syndrome. **J. Infect. Dis.** 156: 175-182, 1987.
- Licence, K., Oates, K.R., Synge, B.A., Reid, T.M.S. An outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. **Epidemiol. Infect.** 126: 135-138, 2001.
- Low, D.A., David, V., Lark, D., Schoolnik, G., Falkow, S. Gene clusters governing the production of hemolysin and mannose-resistant hemagglutination are closely linked in *Escherichia coli* serotype O4 and O6 isolates from urinary tract infections. **Infect. Immun.** 43: 353-359, 1984.
- Macdonald, I.A., Gould, I.M., Curnow, J. Epidemiology of infection due to *Escherichia coli* O157: a 3-year prospective study. **Epidemiol. Infect.** 116: 279-284, 1996.
- Macedo, J.A.B. Águas & Águas. São Paulo. **Varela**, p. 505, 2001.
- Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T. Complete Nucleotide Sequences of 93-kb and 3.3-kb Plasmids of an Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Derived from Sakai Outbreak. 2001. Disponível em: Http: www.dnares.kazusa.or.jp/5/1/01/HTML. Acesso em 12 nov. 2005.
- Martindale, J., Stroud, D., Tang, C.M. Genetic analyses of *Escherichia coli* K1 gastrointestinal colonization. **Mol. Microbiol.** 37 (6): 1293-1305, 2000.
- Martinez, J.L., Delgado-Iribarren, A., Baquero, F. Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. **FEMS Microbiol. Rev.** 75: 45-56, 1990.
- Mason, T.G. & Richardson, G. A review: *Escherichia coli* and the human gut: some ecological considerations. **J. Appl. Bacteriol.** 1: 1-16, 1981.
- McCarthy, T.A., Barret, N.L., Hadler, J.L., Salisbury, B., Howard, R.T., Dingman, D.W., Brinkman, C.D., Bibb, W.F., Cartter, M.L. Hemolytic-uremic syndrome and *Escherichia coli* O121 at a lake in Connecticut. **Pediatrics.** 108: E59, 2001.
- Mead, P.S. & Griffin, P.M. *Escherichia coli* O157:H7. **The Lancet.** 352: 1207-1212, 1998.
- Merbon, M.H., Morris, G.K., Sack, D.A., Wells, J.G., Greech, W.B., Feeley, J.C., Sack, R.B., Kapikan, A.Z., Gangarosa, E.T. Traveller's diarrhea in México: a prospective study of

- American physicians and family members attending a congress. **N. Engl. J. med.** 294: 1299-1305, 1976.
- Monteiro-Neto, V., Bando, S.Y., Moreira-Filho, C.A., Girón, J.A. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. **Cell. Microbiol.** 5 (8): 533-547, 2003.
- Moon, H.W., Whipp, S.C. Argenzio, R.A., Levine, M.M., Giannella, R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbits intestines. **Infect. Immun.** 41: 1340-1351, 1983.
- Moreira, G. C., Carneiro, M.S., Nataro, J.P., Trabulsi, L.R. Role of type 1 fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Letters.** 226: 79-85, 2003.
- Moss, J.E., Idanpaan-Heikkilä, I., Zychlinsky, A. Induction of apoptosis by microbial pathogens. In: Cossart, T., Boquet, P., Normark, S., Rappuoli, R. **Cell. Microbiol.** ASM Press, p. 275-290, 2000.
- Mühlendorfe, G.B. *et al.*, Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from environmental water habits and from stool samples of healthy volunteers. *Res. Microbiol.* v. 147, p. 625-635, 1996.
- Mühlendorfe, I., & Hacker, J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. **Microbiol Pathogenesis.** 16: 171-181, 1994.
- Nataro, J.P. & Kaper, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11: 142-201, 1998.
- Nataro, J.P., Deng, Y., Walker, K. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 176: 4691-4699, 1994.
- Nataro, J.P., Deng, Y., Cookson, S. *et al.* Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J. Infect. Dis.** 171: 465-468, 1995.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., Browne, R.R., Prado, V., Vial, P., Levine, M.M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 6: 829-831, 1987.
- Nataro, J.P., Seriwatana, J., Fasano, A., Maneval, D.R., Guers, L.D., Noriega, F., Dubovsky, F., Levine, M., Moris, J.G.Jr. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. **Infect. Immun.** 63: 4721-4728, 1995.
- Nataro, J.P., Yikang, D., Giron, J.A., Savarino, S.J., Kothary, M.H., Hall, R. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlike plasmid regions. **Infect. Immun.** 61: 1126-1131, 1993.

- Navarro-Garcia, F., Sears, C., Eslava, C., Cravioto, A., Nataro, J.P. Cytoeskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 67 (5): 2184-2192, 1999.
- Nereida, M.R. et al. Prevalence of HEp-2 cell adherent *Escherichia coli* and characterization of enteroaggregative *E.coli* and chain-like adherent *E.coli* isolated from children with and without diarrhea, in Londrina, Brazil. **FEMS microbial. Letters.** V. 210, p. 293-298, 2000.
- Neves K. O., Lanna M. C. S., Siqueira J. M. F., Rocha W. D., Dutra A., Oliveira I. C., Vilano G.S. Estudo microbiológico da água de consumo de bairros periféricos de Ouro Preto e diarreia infantil. In: Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia - Ecotoxicologia e os novos desafios no monitoramento ambiental, 7 e Reunião da Setac Latino-Americana, 5, Vitória, Anais, 1, 2002.
- Nowicki, B., Labigne, A., Moseley, S., Hull, R., Hull, S., Moulds, J. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesions AAF-I and AAF-II, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infect. Immun.** 58: 279-281, 1990.
- Nowicki, B., Selvarangan. R., Nowicki, S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesions: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. **J. infect. Dis.** 183 (Suppl. 1), 524-527, 2001.
- Ohno, A., Marui, A., Castro, E.S., Reyes, A.A.B., Elio-Calvo, D., Kasitani, H., Ishii, Y., Yamaguchi, K. Enteropathogenic bacteria in the La Paz river of Bolivia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 57: 438-444, 1997.
- Ojeniyi, B., Ahrens, P., Meyling, A. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. **J. Vet. Med.** 41: 49-59, 1994.
- Okeke, I. & Nataro, J.P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Lancet. Infect. Dis.** 1: 304-313, 2001.
- Okeke, I.N., Scalestky, I.C.A., Soars, E.H., Macfarlane, L.R., Torres, A.G. Molecular epidemiology of the Iron utilization genes of Enteraggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** 42 (1): 36-44, 2004.
- Old, D.D., Tavendale, A., Yakubu, D.E. Some strains of *Escherichia coli* of putative enteroadherent-aggregative serotypes produce an unusual fibrillar haemagglutinin. **FEMS Microbiol. Lett.** 59: 87-92, 1989.
- Ørskov, I., & Ørskov, F. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. **J. Hyg.** 95: 551-575, 1985.
- Ørskov, I., Wachsmuth, I. K., Taylor, D.N., Echeveria, P., Rowe, B., Sakazaki, R., Ørskov, F. Two new *Escherichia coli* O groups: O172 from "Shigella-like" toxin producing strains

- (EHEC) and O173 from enteroinvasive *E. coli* (EIEC). **Acta Pathol. Microbiol. immunol. Scand.** 90: 30-32, 1991.
- Patel, S.K., Dotson, J., Allen, K.P., Fleckenstein, J.M. Identification and Molecular Characterization of EatA, an autotransporter Protein of enterotoxigeni *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 72 (3): 1786-1794, 2004.
- Paton, A.J.C. & Paton, A.W. Pathogenes and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.** 11: 450-479, 1998a.
- Paton, A.W. & Paton, J.C. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. Coli* HlyA, *rfbO111*, and *rfb O 159*. *J. Clinical Microbiol.* **36**: 598-602, 1998b.
- Paton, A.W. & Paton, J.C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* and *saa*. **J. Clin. Microbiol.** 40: 271-274, 2002.
- Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C., Paton, J.C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesion produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect. Immun.** 69: 6999-7009, 2001.
- Pereira, G.I. Avaliação do perfil de resistência aos antibióticos das cepas de *Escherichia coli* isoladas de água de consumo da cidade de Ouro Preto e determinação dos sorotipos enteropatogênicos. Trabalho de Conclusão de curso, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Ouro Preto, 2003.
- Pickett, C. L., Pesci, E. C., Cottle, D. L., Russel, G., Erdem, A. N., Zeytin, H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter sp.* *cdtB* genes. **Infect. Immun.** **64** (4): 2070-2078, 1996.
- Pratt, L.A. & Kolter, R. Genetic analyses of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type 1 pili. **Mol. Microbiol.** 30: 285-293, 1998.
- Prevost, M.C, Lesourd, M., Arpin, M., Vernel, F., Mounier, J., Hellio, R., Sansonetti, P.J. Unipolar reorganization of F-actin layer at bacterial division and bundling of actin filaments by plastin correlate with movement of *Shigella flexneri* within HeLa cells. **Infect. Immun.** 60: 4088-4099, 1992.
- Qadri, F., Haque, A., Faruque, S.M., Bettelheim, K.A., Robinson-Browne, R., Albert, M.J. Hemagglutinating properties of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** 32: 510-514, 1994.
- Rao, M.C. Toxins with active guanylate cyclase: heat-stable enterotoxins. **Ciba Found Symp.** 112: 74-93, 1985.
- Rennie, R.P. & Arbuthnott, J.P. Partial characterization of *Escherichia coli* haemolysin. **J. Med. Microbiol.** 7: 179-188, 1974.

- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.** 308: 681-685, 1983.
- Rivera N. G. & Martins M. T. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. **Rev. Ciênc. Farm.** 17: 115-136, 1996.
- Rosa, A.C.P., Vieira, M.A.M., Tibana, A., Gomes, T.A.T., Andrade, J.R.C. Interactions of *Escherichia coli* strains of non-EPEC serogroups that carry eae and lack the EAF and stx gene sequences with undifferentiated and differentiated intestinal human Caco-2 cells. **FEMS Microbiol. Lett.** 200: 117-122, 2001.
- Sabione J. G. Avaliação da Eficiência do Filtro de Areia na Redução Microbiana em Água de Consumo. **Rev. Higiene Alimentar**, 15(84): 75-78, 2001.
- Sack, D.A. & Sack, R.B. Test for enterotoxin *Escherichia coli* using Y1 adrenal cells in miniculture. **Infect. Immun.** 45: 334-336, 1975.
- Samadpour, M., Stewart, J., Steingart, K., Addy, C., Louderback, J., McGinn, M., Ellington, J., Newman, T. Laboratory investigation of an *E. coli*O157:H7 outbreak associated with swimming in battle ground lake. **J. Environ. Health.** 64: 16-20, 2002.
- Sansonetti, J. Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness: from cell assay system to shigellosis. P.1-19. In: Sansonetti, P.J (ed). **Pathogenesis of Shigellosis**. CTML. 180. Springer Verlag Berlin-Heidelberg, 1992.
- Sato, M.I., Snchez, P.S., Martins, M.T., Dos Reis, M.H.L., Trabulsi, L.R. Isolation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in water and sewage in São Paulo, Brazil. **Rev. Microbiol.** 14 (4): 276-281, 1983.
- Savageau, M.A. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. **Am. Nat.** 122:732-744, 1983.
- Savarino, S.J., Fasano, A., Robertson, D.C., Levine, M.M. Enteraggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest.** 87: 1450-1455, 1991.
- Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M., Fasano, A. Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteraggregative *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** 73 (4): 1019-1022, 1996.
- Scaletsky, C.A., *et al.*, Phenotypic and genetic features of *Escherichia coli* strains showing simultaneous expression of localized and diffuse adherence. **FEMS Immun. Microbiol.**, v. 23, p. 181-188, 1999a.
- Scaletsky, I.C., Pedroso, M.S., Morais, M.B., Carvalho, R.L., Silva, R.M., Fabbriotti, S.H., Fagundes-Neto, U. Association of patterns of *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells with acute and persistent diarrhea. **Arq. Gastroenterol.** 36: 54-60, 1999b.

- Scaletsky, I.C.S., Silva, M.L.M., Trabulsi, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.** 45: 534-536, 1984.
- Schembri, M.A., & Klemm P. Biofilm formation in a Hydrodynamic Environment by novel fimH variants and ramifications for virulence. **Infect. Immun.** 69 (3): 1322-1328, 2001.
- Schembri, M.A., Dalsgaard, D., Klemm P. Capsule shields the function of short bacterial adhesions. **J. Bacteriol.** 186 (5): 1249-1257, 2004.
- Schembri, M.A., Hjerrild, L., Gjermansen, M., Klemm, P. Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. **J. Bacteriol.** 185 (7): 2236-2242, 2003.
- Schmidt, H., & Karch, H. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic uremic syndrome. **J. Clin. Microbiol.** 34: 2364-2367, 1996b.
- Schmidt, H., Kernbach, C., Karch, H. Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O156: H7. **Microbiol.** 142: 907-914, 1996.
- Schultsz, S., *et. al.*, Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **J. Clin. Microbiol.** 32: 2393-2397, 1994.
- Sears, C.L. & Kaper, J.B. Enteric bacterial toxin mechanism of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.** 60: 167-215, 1996.
- Sereny, B. Experimental *Shigella* conjunctivitis. **Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.** 2: 293-296, 1955.
- Servin A.A. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 18: 264-292, 2005.
- Sheikh, J., Czczulin, J.R., Harrington, S., Hicks, S., Henderson, I.R., Le Bouguénec, C., Gounon, P., Phillips, A.D., Nataro, J.P. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.** 110: 1329-1337, 2002.
- Sheikh, J., Susan, H., Dall'angiol, Phillips, A.D., Nataro, J.P. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 41: 983-997, 2001.
- Shere, J.A., Bartlett, K.J., Kaper, C.W. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms Winsconsin. **Appl. Environ. Microbiol.** S64S: 1390-1399, 1998.

- Sixmar, T.K., Kalk, H., Van Zanten, B.A., Dauter, A., Kingma, J., Witholt, B., Hol, W.G. Refined structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin, a close relative of cholera toxin. **J. Mol. Biol.** 230: 890-918, 1993.
- Soderling, O. & Mollby, R. Studies on *Escherichia coli* in pigs. V. Determination of enterotoxigenicity and frequency of O group and K88 antigen in strains from 200 piglets with neonatal diarrhea. **Zentralb. Veterinaarmed. Reihe.** 25: 719-728, 1978.
- Sohel, I., *et al.*, Enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. **J. Bacteriol.** 178: 2613-2628, 1996.
- Solo-Gabrile, H.M., Wolfert, M.A., Desmarais, T.R., Palmer, C.J. Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 230-237, 2000.
- Stein, M., Kenny, B., Murry, A., Stein, M.A., Finlay, B. Characterization of EspC, a 110-Kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. **J. Bacteriol.** 178 (22): 6546-6554, 1996.
- Stone, K.D., Zhang, H.Z., Carlson, L.K., Donnenberg, M.S. A cluster of fourteen genes from Enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient to biogenesis of type IV pilus. **Mol. Microbiol.** 20: 313-323, 1996.
- Sussman, M. *Escherichia coli*: Mechanisms of virulence. Cambridge University press, 1997.
- Suzart, S. Guth, B.E.C., Pedroso, M.Z., Okafor, U.M., Gomes T.A.T. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. **FEMS Microbiol. Letters.** 201: 163-168, 2001.
- Swedlow, D.L., Woodruff, B.A., Brady, R.C., Griffing, P.M., Tippen, S., Donnel Jr, H.D., Gelderich, E., Payne, B.J., Meyer Jr, A., Wells, J.G., Greene, K.D., Bright, M., Bean, N.H., Blake, P.A. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Ann. Intern. Med.** 117: 812-819, 1992.
- Taddei, C.R., Fasano, A., Ferreira, A.J.P., Trabulsi, L.R., Martinez, M.B. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. **FEMS Microbiol. Lett.** V: 1-7, 2005.
- Taddei, C.R., Moreno, A.C.R., Filho, A.F., Montenor, L.P.G., Martinez, M.B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. **FEMS Microbiol. Lett.** 227: 249-253, 2003.
- Tarr, P.I. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. **Clin. Infect. Dis.** 20: 1-10, 1995.

- Taylor, J., Echeverria, P., Pal, T., Sethabutr, O., Saiborisuth, S., Srichamom, S., Rowe, B., Cross, J. The role of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. **J. Clin. Microbiol.** 26: 1362-1366, 1988.
- Tenenberg, S., Hirst, T.R., Angstrom, J., Karisson, A. Comparison of the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-stable toxin in infant rabbit small intestine. **Glycocon. J.** 11: 533-540, 1994.
- Thomas, L.V., Cravioto, A., Scotland, S.M., Rowe, B. New fimbrial antigen type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. **Infect. Immun.** 35: 1119-1124, 1982.
- Toledo, M.R., Alvariza, C., Murahovschi, J., Ramos, S.R., Trabulsi, L.R. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infect. Immun.** 39: 586-589, 1983.
- Toledo, M.R.R., Fontes, C.F., Trabulsi, L.R. Mili: um meio para realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Rev. Microbiol.** 13: 230-235, 1982.
- Toledo, M.R.R., Fontes, C.F., Trabulsi, L.R. EPM: modificação do meio de Rugai & Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir de glicose, h₂s, urease e triptofanodesaminase. **Rev. Microbiol.** 13: 309-315, 1982.
- Toze, S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. **Water. Res.** 33 (17): 3545-3556, 1999.
- Trabulsi, L.R., Keller, R., Gomes, T.A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.** 8: 508-513, 2002.
- Trabulsi, L.R.; Campos, L.C.; Whittan, T.S.; Gomes, Tat.; Rodrigues, J., Gonçalves, A.G. Traditional and non-traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **Rev. microbial.** 27: 1-6, 1996.
- Tran Van Nhieu, G., Bourdet-Sicard, R., Dumenil, G., Blocker, A., Sansonetti, P.J. bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. **Cell. Microbiol.** 2: 187-193, 2000.
- Tsai, C.C.; Yu, C.; Tsen, H.Y. Screening the enteroaggregative *Escherichia coli* activity and detection of aggA, aafA and astA genes with novel PCR primer for the *Escherichia coli* isolates from diarrhea cases in Taiwan. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** 46: 159-165, 2003.
- Tzipori, S., Montnaro, J., Robins-Browne, R.M., Vial, P., Gibson, R., Levine, M.M. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in gnotobiotic piglet gastroenteritis model. **Infect. Immun.** 60: 5302-5306, 1992.

- Tzipori, S.J., Wachsmuth, I.K., Chapman, C., Birner, R., Brittingham, J., Jackson, C., Hogg, J. The pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by *E. coli* O157: H7 in gnotobiotic piglet. **J. Infect. Dis.** 154: 712-716, 1986.
- U.S. Department of Health and Human Services. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami – Washington and California. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.** 44: 157-159, 1995.
- Valentini, S.R., Gomes, T.A.T., Falcão, D.P. Lack virulence factors in *Escherichia coli* Enteropathogenic serogroups isolated from water. **App. Environm. Microbiol.** 58 (1): 412-414, 1992.
- Vial, P.A., Brownw, R.R., Lior, H., Prado, V., Kaper, J.B., Nataro, J.P. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. **J. Infect. Dis.** 158: 70-79, 1987.
- Wakimoto, N. et al. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 71(5): 687-690, 2004.
- Wang, G. & Doyle, M.P. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. **J. Food. Protection.** 61: 662-667, 1998.
- Warner, M., Kuo, K., Willians, L., Adam, B., Langkop, C., Ruden, R., Francis, B., Haupt, T. Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7: Illinois. **Mor. Mortl. Wkly. Rep.** 45: 437-439, 1996.
- Whipp, S.C. Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. **Infection and Immunity.** 58:930-934, 1990
- Whitfield, C. & Roberts, I.S. Structure, assembly and regulations of expression of capsules in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 31: 1307-1319, 1999.
- Whittam, T.S., Wolfe, M.L., Wachsmuth, I.K., Orskov, F., Orskov, I., Wilson, R.A. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. **Infect. Immun.** 61: 1619-1629, 1993.
- World Health Organization **Water supply sanitation and hgiene links to health.** www.who.int/phe. 2002a.
- World Health Organization **Guidelines for drinking water quality.** http://www.who.int/water_sanitation_health/GDWQ/Microbiology/GWDWQmicrobiological2.html 2002b.
- World Health Organization. Guidelines for drinking water quality – Health criteria and other supporting information. 2: Second ed. **WHO**. Geneva, 1997.
- Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurozono, H., Takeda, Y., Yoshida, O. Detection of urovirulence factor in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 12: 85-95, 1995.

- Yamamoto, T. & Echeverria, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains pathogenic for humans. **Infect. Immun.** 64: 1441-1445, 1996.
- Yamamoto, T. & Nakazawa, M. Detection and sequences of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.** 35: 223-227, 1997.
- Yamamoto, T., Endo, S., Yokota, T., Escheverria, P. Characteristics of adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to human and animal mucosa. **Infect. Immun.** 59(10): 3722-3739, 1991.
- Yamamoto, T., Wakisaka, N., Fumihiko, S., Kato, A. Comparison of nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 147: 89-95, 1997.
- Yamamoto, T., Wakisaka, N., Nakae, T., Kamano, T., Serichantalergs, O., Escheverria, P. Characterization of a novel hemagglutinin of diarrhea-associated *Escherichia coli* that has characteristics of diffusely adhering *E. coli* and enteroaggregative *E. coli*. **Infect. Immun.** 64: 3694-3702, 1996.
- Yarsh, J.C. & Chase, M.P. *E. coli* O157:H - another waterborne outbreak! **Am. J. Gastroenterol.** 95: 1096, 2000.
- Yatsuyanagi, J. Saito, Ito, I. A case of hemolytic-uremic syndrome associated with shiga toxin-2-producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces. **Jpn. J. Infect. Dis.** 55: 174-176, 2002.
- Yu, J. & Kaper, J.B. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol. Microbiol.** 6: 411-417, 1992.